

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Βιολογική, μοριακή, μορφολογική διαφοροποίηση και
χημική αντιμετώπιση δύο βιοτύπων του ζιζανίου τάτουλα
(*Datura stramonium*)**

Νικολαΐδου Παρθένα

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβλήθηκε στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μερική υποχρέωση για τη λήψη Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Κατεύθυνση: “**Σύγχρονη Φυτοπροστασία**”.

ΒΟΛΟΣ 2007

**Βιολογική, μοριακή, μορφολογική διαφοροποίηση και
χημική αντιμετώπιση δύο βιοτύπων του ζιζανίου τάτουλα
(*Datura stramonium*)**

Εξεταστική επιτροπή

Πέτρος Χ. Λόλας
Καθηγητής Ζιζανιολογίας Π.Θ. -
Επιβλέπων

Εμμανουήλ Βαρδαβάκης
Λέκτορας Συστηματικής
Βοτανικής Π.Θ. - Μέλος

Αθανάσιος Μαυρομάτης
Λέκτορας Γενετικής &
Βελτίωσης Φυτών Π.Θ. -
Μέλος

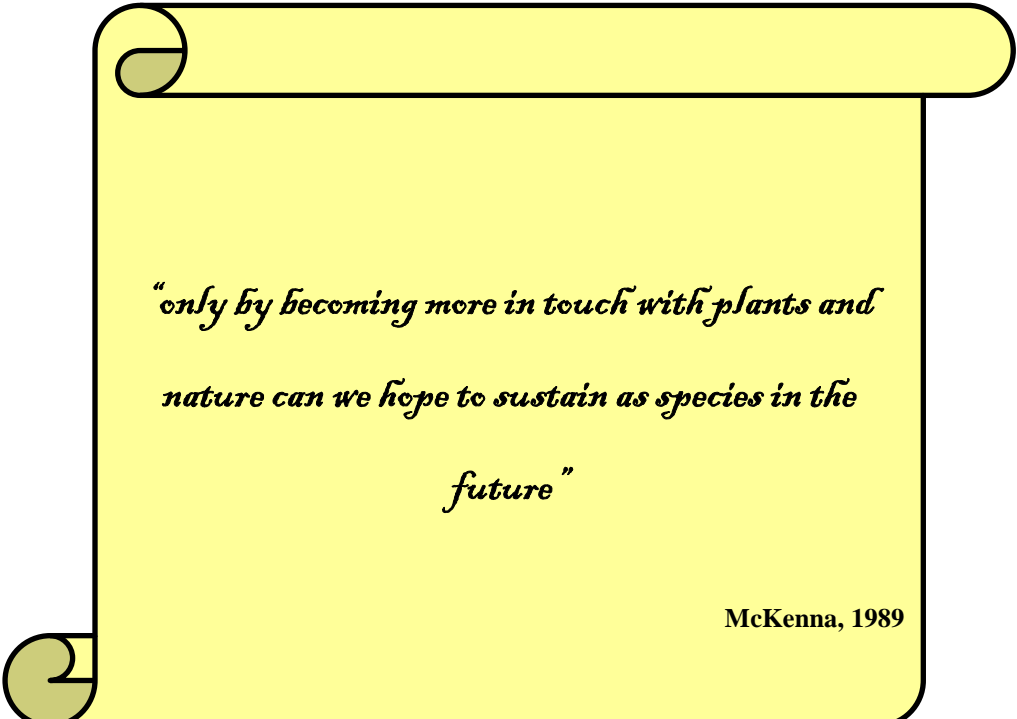
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πολλές ευχαριστίες θα επιθυμούσα να εκφράσω στον κ. Πέτρο Λόλα, Καθηγητή Ζιζανιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέποντα καθηγητή μου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ και να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του, στη διεξαγωγή του πειράματος και συγγραφή της πτυχιακής.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Εμ. Βαρδαβάκη, Λέκτορα Συστηματικής Βοτανικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Αθ. Μαυρομάτη, Λέκτορα Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις χρήσιμες υποδείξεις και διορθώσεις τους, στη συγγραφή και εξέταση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον δεύτερο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω το μοριακό μέρος της εργασίας στο εργαστήριο το οποίο διευθύνει παραχωρώντας το χώρο αλλά και τον εξοπλισμό.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στο προσωπικό του Αγροκτήματος και ιδιαίτερα στον γεωπόνο κ. Σ. Σουίπα, για τη βοήθειά του στην εγκατάσταση του πειράματος και τη διεξαγωγή των εργασιών. Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω τις ευχαριστίες μου στον διδάκτορα του εργαστηρίου Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών κ. Αθ. Κορκόβελο για την πολύτιμη συνεισφορά του κατά τη διεξαγωγή του μοριακού μέρους της εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένειά μου και τους φίλους μου και ιδιαίτερα το Γιώργο και τη Δήμητρα για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



*“only by becoming more in touch with plants and
nature can we hope to sustain as species in the
future”*

McKenna, 1989

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ζιζάνια, αποτελώντας έναν από τους βιολογικούς ρύπους ενδιαφέρουν άμεσα τη φυτοπροστασία καθιστώντας τον έλεγχό τους απαραίτητο σχεδόν σε κάθε αγροοικοσύστημα.

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτελεί ένα ζιζάνιο με μεγάλη ιστορική διαδρομή και εξάπλωση σε όλες τις θερμές περιοχές του κόσμου. Το επιστημονικό όνομα του ζιζανίου είναι *Datura stramonium*, γνωστό ως τάτουλας και «διαβολόχορτο».

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της μορφολογίας, βιολογίας, χημικής αντιμετώπισης και μοριακής ανάλυσης τριών βιοτύπων τάτουλα (Πράσινος – Νίκαια, Κόκκινος – Νίκαια, Πράσινος - Βελεστίνο) με διαφορετική γεωγραφική προέλευση. Τα πειράματα έγιναν στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου αλλά και σε συνθήκες εργαστηρίου. Στον αγρό μελετήθηκαν η βιολογία, μορφολογία και η χημική αντιμετώπιση. Το εργαστηριακό μέρος του πειράματος σε ελεγχόμενες συνθήκες, αφορούσε το εργαστήριο Ζιζανιολογίας για τη μελέτη της βλαστικότητας των σπόρων και τη χημική αντιμετώπιση του ζιζανίου καθώς και το εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών για τη μοριακή ανάλυση.

Στη μελέτη της βλαστικότητας, χρησιμοποιήθηκαν 4 επεμβάσεις με σπόρο συλλογής 2005 σε δύο θερμοκρασίες (15 και 25°C) και δύο φωτοπερίόδους (24h σκοτάδι και 16/8h φως/σκοτάδι). Στον βιότυπο πράσινος – Νίκαια (Π-N) τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (100%) παρατηρήθηκαν σε συνεχές σκοτάδι στους 25°C για τους σπόρους που δέχθηκαν τρίψιμο με γυαλόχαρτο (απώλεια βάρους περίπου 2.5%) και βλάστηση σε διάλυμα GA₃ 1mg/mL και GA₃ 0.5mg/mL. Ο βιότυπος κόκκινος – Νίκαια (K-N) παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης (96.6%) στους 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι, στις ίδιες με τον προηγούμενο βιότυπο μεταχειρίσεις και επιπλέον στο KNO₃ 0.2%. Στον βιότυπο Πράσινο – Βελεστίνο (Π-B) εντοπίστηκε βαθύς λήθαργος με πολύ μικρά ποσοστά βλάστησης.

Τα σημαντικότερα στάδια του βιολογικού κύκλου του ζιζανίου προσδιορίστηκαν με βάση την κλίμακα B.B.C.H. και καταγράφηκαν από την ημέρα της σποράς. Η εμφάνιση των κοτυληδόνων πραγματοποιήθηκε σε 13 – 16 ημέρες και το πρώτο πραγματικό φύλλο σε 22 – 25 ημέρες και για τους τρεις βιότυπους. Από την

εμφάνιση του πρώτου άνθους, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του βιότυπου Π-B ως προς τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου για αυτόν σε σύγκριση με τους άλλους δύο. Το χρονικό διάστημα από τη σπορά μέχρι την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των φυτών ήταν 192 μέρες για τον βιότυπο Π-B, 133 μέρες για τον Π-N και 159 μέρες για τον Κ-N.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ζιζανίου μελετήθηκαν στον αγρό και βρέθηκε ότι ο βιότυπος Κ-N είχε μεγαλύτερο ύψος, γεγονός που μπορεί να οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μετρήσεις έγιναν επίσης για το σχήμα των κοτυληδόνων, τις διαστάσεις του πρώτου φύλλου, το χρώμα και μέγεθος του άνθους καθώς και για χαρακτηριστικά του καρπού και των σπόρων.

Για τον χημικό έλεγχο αξιολογήθηκαν 9 ζιζανιοκτόνα: 1 προσπαρτικό ενσωματούμενο (trifluralin), 6 προφυτρωτικά (aclonifen, acetochlor, isoxaflutole, dimethenamid, mesotrione + acetochlor και napropamide), 2 μεταφυτρωτικά (mesotrione και imazamox). Ικανοποιητικό έλεγχο (>75%) έδωσαν τα acetochlor, isoxaflutole, dimethenamid, mesotrione + acetochlor, mesotrione και imazamox.

Η μοριακή ανάλυση διερεύνησε τη φυλογενετική σχέση και τις γενετικές αποστάσεις έξι βιοτύπων *D. stramonium* και τεσσάρων βιοτύπων *Xanthium strumarium* (αγριομελιτζάνα) με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών SSR και RAPD. Με βάση τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ο ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ του τάτουλα και της αγριομελιτζάνας καθώς και η διάκριση των βιοτύπων μεταξύ τους για κάθε ένα από τα ζιζάνια. Η ομοιότητα των δενδρογραμμάτων που προέκυψε μετά από την εφαρμογή των δύο μοριακών δεικτών κατέστησε περισσότερο ασφαλή τα αποτελέσματα αυτά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
2. ΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟ ΤΑΤΟΥΛΑΣ (<i>Datura stramonium</i>)	11
2.1. Γενικά	11
2.2. Βιολογία	11
2.3. Μορφολογία	12
2.4. Αντιμετώπιση	13
3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	15
3.1. Γενικά	15
3.2. Ιστορική αναδρομή	15
3.3. Χρήσεις	16
3.4. Ζημιές από το ζιζάνιο	17
3.4.1. Μείωση απόδοσης της καλλιέργειας	17
3.4.2. Τοξικές επιδράσεις σε ζώα και άνθρωπο	18
3.4.3. Ξενιστές εντόμων-ασθενειών	19
3.4.4. Αλληλοπάθεια	19
3.5. Μοριακή ανάλυση	20
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
4.1. Γενικά	22
4.2. Βιολογία τάτουλα	22
4.2.1. Πείραμα στο εργαστήριο	22
4.2.2. Πείραμα αγρού	24
4.3. Μορφολογία τάτουλα	25
4.4. Χημική αντιμετώπιση του ζιζανίου τάτουλα	26
4.4.1. Ζιζανιοκτόνα μελέτης	26
4.4.2. Πείραμα στον αγρό	30
4.4.3. Πείραμα στο εργαστήριο	31
4.5. Μοριακή ανάλυση βιοτύπων τάτουλα και αγριομελιτζάνας	31
Σύνολο	32
4.5.1. Απομόνωση DNA	32
4.5.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων	34
4.6. Στατιστική Ανάλυση	35
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
5.1. Βιολογία	37
5.1.1. Βλαστικότητα	37
5.1.2. Ρυθμός βλάστησης	41
5.1.3. Βιολογικός κύκλος – Στάδια ανάπτυξης	44
5.2. Μορφολογία	48
5.3. Χημική αντιμετώπιση	51
5.3.1. Πείραμα στον αγρό	51
5.3.2. Πείραμα στο εργαστήριο	52
5.4. Μοριακή ανάλυση	54
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ζιζάνια, σύμφωνα με τον συμβατικό ορισμό, είναι όλα τα φυτά, αυτοφυή ή καλλιεργούμενα, όσα φυτρώνουν εκεί όπου δεν τα σπέρνουν ή με άλλα λόγια οποιοδήποτε φυτό έξω από τη θέση του, μεγαλώνει δηλαδή εκεί όπου δεν χρειάζεται ή μεγαλώνει στη θέση ενός άλλου χρήσιμου φυτού. Εάν και τότε ένα φυτό χαρακτηρίζεται ζιζάνιο εξαρτάται από το πώς επηρεάζει τη χρησιμοποίηση του αγροοικοσυστήματος από τον άνθρωπο.

Τα ζιζάνια ίσως είναι σήμερα το σημαντικότερο πρόβλημα στη γεωργία. Σε αντίθεση με τα έντομα και τις ασθένειες, τα ζιζάνια εμφανίζονται στα αγροοικοσυστήματα κάθε χρόνο και εάν δεν ελεγχθούν, τότε όχι μόνο μειώνουν τις αποδόσεις αλλά επηρεάζουν και την ποιότητα των προϊόντων. Είναι γνωστό ότι κάθε χρόνο 10 έως 50 διαφορετικά είδη ζιζανίων εμφανίζονται και μπορεί να προξενήσουν σημαντικές ζημιές στις κύριες καλλιέργειες. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί περισσότερα από 150 είδη ζιζανίων.

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων στις περισσότερες καλλιέργειες μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη λήψη αποτελεσματικών μέτρων και τη χρησιμοποίηση κατάλληλων μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτές διακρίνονται σε πέντε βασικές κατηγορίες τις καλλιεργητικές, τις φυσικές-μηχανικές, τις βιολογικές, τις βιοτεχνολογικές και τις χημικές. Ωστόσο, στη σύγχρονη γεωργία δεν αρκεί η αντιμετώπιση των ζιζανίων να είναι αποτελεσματική αλλά θα πρέπει παράλληλα να είναι οικονομική και ανάλογη των επιδιώξεων του ανθρώπου. Στόχος δηλαδή είναι η μεγιστοποίηση των αποδόσεων με το μικρότερο οικονομικό κόστος και ταυτόχρονα τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας και προστασίας του περιβάλλοντος.

Η χημική μέθοδος στη σημερινή, συμβατική γεωργία αποτελεί τη βάση των προγραμμάτων ελέγχου των ζιζανίων και συμπληρώνεται κατά περίπτωση από τις άλλες μεθόδους. Η εφαρμογή της αφορά τον έλεγχο των ζιζανίων με τη χρησιμοποίηση συνθετικών ουσιών, των ζιζανιοκτόνων. Η σπουδαιότητά τους φαίνεται από το ποσοστό που κατέχουν στο σύνολο των γεωργικών φαρμάκων και αγγίζει το 60-70%.

Πέρα από τις άμεσες, μεγάλης σπουδαιότητας ζημιές που προκαλεί η παρουσία των ζιζανίων στην απόδοση και ποιότητα των γεωργικών προϊόντων, αυτά

επιηρεάζουν και έμμεσα τον άνθρωπο. Ο τάτουλας αποτελεί ζιζάνιο γνωστό για τις δηλητηριώδεις ιδιότητές του μετά την κατανάλωσή του από τα ζώα και τον άνθρωπο.

Αντικείμενο μελέτης της μεταπτυχιακής διατριβής, ήταν η βιολογία, μορφολογία και χημική αντιμετώπιση του κοινού ζιζανίου τάτουλα (*Datura stramonium*). Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση 6 βιοτύπων τάτουλα αλλά και 4 βιοτύπων αγριομελιτζάνας (*Xanthium strumarium*) εξετάζοντας τη φυλογενετική σχέση και τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους. Τα ζιζάνια αυτά είναι κοινά στον Ελλαδικό χώρο και συναντώνται εύκολα στο περιβάλλον. Τα πειράματα έγιναν στο Αγρόκτημα του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και στα Εργαστήρια Ζιζανιολογίας και Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών.

2. ΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟ ΤΑΤΟΥΛΑΣ (*Datura stramonium*)

2.1. Γενικά

Ο τάτουλας (*Datura stramonium* L.) είναι ετήσιο φυτό. Ανήκει στην οικογένεια Solanaceae η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 2400 είδη (McKenna, 1989) και το γένος *Datura*. Το γένος *Datura* αποτελείται από 15 είδη φυτών, ποώδη έως θάμνους ή και δένδρα, τα οποία συναντάμε σε όλες τις θερμές περιοχές του κόσμου. Όσον αφορά την προέλευση του ζιζανίου τάτουλα υπάρχουν διαφωνίες μεταξύ των βοτανολόγων. Πολλοί Ευρωπαίοι βοτανολόγοι μεταξύ αυτών και ο Λινναίος, αναφέρουν τη Βόρεια Αμερική ως περιοχή προέλευσης του ζιζανίου (Mountain, 1987). Ο Nuttall (1700) θεωρεί τη Νότια Αμερική ή Ασία με αυξημένες πιθανότητες χώρα της Ανατολής ενώ ο de Candolle (1855) δίνει την εκδοχή περιοχής στα σύνορα της Κασπίας θάλασσας. Οι αθίγγανοι υποστηρίζεται ότι είναι υπεύθυνοι για την εξάπλωση του φυτού από χώρα σε χώρα με τη μεταφορά σπόρων (www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thornal2.html).

Στη διεθνή βιβλιογραφία το συναντάμε με τα ονόματα: Jimson weed, gypsum weed, Loco weed, Thorn apple Angel's Trumpet και Zombie's Cucumber. Στην Ελληνική βιβλιογραφία αναφέρεται ως τάτουλα, «διαβολόχορτο», κ.ά.

2.2. Βιολογία

Ο τάτουλας είναι κυρίως φυτό αυτογονιμοποιούμενο με ποσοστό σταυρογονιμοποίησης 1,3-18,7% σύμφωνα με στοιχεία του Valverde και των συνεργατών του (2003). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Motten και Antonovics (1992). Ο συνήθης χρωμοσωμικός αριθμός που συναντάται είναι ο $2n=24$ (Mountain, 1987) ενώ έχει παρατηρηθεί από τον Blakeslee (1931) η παρουσία τρισωμικών ($2n+1$) ατόμων. Βοτανικά ανήκει στα δικοτυλήδονα.

Το κοινό διαβολόχορτο είναι εαρινό ζιζάνιο. Αναπτύσσεται την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο. Όσον αφορά το έδαφος προτιμά τα ουδέτερα και βασικά καλά στραγγιζόμενα εδάφη (Morris, 2004). Οι σπόροι του ζιζανίου διατηρούν τη βλαστικότητα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και ο αριθμός τους ανά φυτό μπορεί να φθάσει ετησίως τις 23.000 (Levitt & Lovett, 1983). Ο Heiser (1969) διαπίστωσε τη βλαστικότητα αποθηκευμένων σπόρων 39 ετών σε ποσοστό 90%. Ωστόσο, η

βλαστικότητα ποικίλει με βάση πειραματικά αποτελέσματα, γεγονός στο οποίο συμβάλουν σημαντικά παράγοντες όπως η ηλικία των σπόρων καθώς και ο λήθαργος στον οποίο εμπίπτουν μετά την ωρίμανσή τους (Sanchez et al., 1990). Ο Mes (1955) αναφέρει ότι φρέσκοι σπόροι εμφανίζουν μικρή ή καθόλου βλάστηση σε οποιοσδήποτε συνθήκες και με οποιοσδήποτε επεμβάσεις. Αντίστοιχα, οι Rogers και Stearns (1957) σημείωσαν τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης σε σπόρους που συλλέχθηκαν 1-2 χρόνια πριν σε σχέση με εκείνους που μόλις έχουν συλλεχθεί. Μεταχειρίσεις όπως εμβάπτιση σε νερό, εναλλαγή φωτός με σκοτάδι σε θερμοκρασία 15°C, είναι μερικές από τις μεταχειρίσεις που βρέθηκε να είναι αποτελεσματικές στο σπάσιμο του λήθαργου του τάτουλα (Andersen, 1968).

Ο Hocombe (1965) αναφέρει υψηλά ποσοστά βλάστησης που φθάνουν το 80% μετά από παραμονή των σπόρων για 3 ημέρες σε νερό το οποίο αλλάζει κάθε 15 min. Ο Maguire και Overland (1967) παρατήρησαν βλάστηση μόλις 8% σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία 15°C και το 88% όταν στην ίδια θερμοκρασία έχουμε εναλλαγή με φως (Andersen, 1968). Ο Hall και οι συνεργάτες του (1991) σημείωσαν βλαστικότητα σε ποσοστό 36% μετά από εφαρμογή γιββεριλλίνης σε συγκέντρωση 10⁻² g/L.

2.3. Μορφολογία

Το είδος *Datura stramonium* είναι ετήσιο. Παρουσιάζει μεγάλο μέγεθος, με πολυάριθμους βλαστούς που δίνουν την εικόνα του θάμνου στο φυτό. Στα γόνιμα εδάφη το μέγεθος του αυξάνει σημαντικά (www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thorna12.html). Το ύψος του ποικίλει από 30 έως 150cm (<http://en.wikipedia.org/wiki/Daturastramonim>).

Ο βλαστός είναι όρθιος και ισχυρός. Είναι λείος στην υφή και χρώματος πρασινοκίτρινου ή κοκκινωπού ανάλογα με το βιότυπο. Φέρει βραχίονες που επαναλαμβάνονται εναλλακτικά και διακλαδίζονται ενώ στη βάση των διακλαδώσεων εμφανίζουν ένα φύλλο μαζί με ένα άνθος.

Τα φύλλα του είναι μεγάλα με μήκος 10-15 cm κυματιστά και οδοντωτά στην περιφέρεια. Οι νευρώσεις τους είναι έντονες σαφώς ανεπτυγμένες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων είναι λεία με σκούρο πράσινο χρώμα ενώ η κάτω επιφάνεια είναι πιο ανοιχτόχρωμη (www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thorna12.html).

Το άνθος του τάτουλα είναι διακριτικό χαρακτηριστικό του ζιζανίου. Παρουσιάζει σχήμα χωνιού, με χρώμα λευκό ή μοβ και μήκος 5-12,5cm (<http://en.wikipedia.org/wiki/Daturastramonim>). Ο κάλυκας είναι μακρύς, σωληνωτός με 5 κοφτερές γωνίες ενώ η στεφάνη φέρει πτυχώσεις. Το άνθος ανοίγει τις απογευματινές ώρες και ελευθερώνει έντονο άρωμα.

Ο καρπός, είναι κάψα. Έχει αυγοειδές σχήμα, χρώμα πράσινο και μεγάλο μέγεθος που φθάνει εκείνο του καρυδιού με αιχμηρά αγκάθια να καλύπτουν την εξωτερική επιφάνειά του.

Τέλος το ριζικό σύστημα του φυτού είναι πασαλώδες. Φέρει μεγάλο αριθμό τριχιδίων με χρώμα υπόλευκο.

2.4. Αντιμετώπιση

Ο τάτουλας, όπως προαναφέρθηκε είναι ζιζάνιο που παράγει μεγάλο αριθμό σπόρων το χρόνο. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ακανόνιστη βλάστησή τους καθιστά απαραίτητη τη λήψη προληπτικών μέτρων αντιμετώπισής του. Το σπουδαιότερο από τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα είναι η αποφυγή μόλυνσης μιας περιοχής στην οποία δε φύεται το ζιζάνιο. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με την αγορά πιστοποιημένων καλλιεργούμενων σπόρων απαλλαγμένων από τους σπόρους του ζιζανίου και με τον κατάλληλο καθαρισμό του μηχανολογικού εξοπλισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Στην περίπτωση πραγματοποίησης μόλυνσης μιας περιοχής χρήσιμη είναι η εφαρμογή φυσικών και καλλιεργητικών πρακτικών. Η εναλλαγή καλλιεργειών με εκείνες που ευνοούν την ανάπτυξη του ζιζανίου και άλλες που δεν την ευνοούν αποτελεί πρακτική ικανή να περιορίσει το πρόβλημα του τάτουλα.

Ωστόσο ο χημικός έλεγχος σύμφωνα με πολλούς επιστήμονες είναι ο οικονομικότερος τρόπος αντιμετώπισης γενικότερα των ζιζανίων και ειδικότερα του τάτουλα. Ιδιαίτερα σημαντική στην περίπτωση αυτή σύμφωνα με τον Mountain (1987) είναι η εφαρμογή προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων.

Το chlorsulfuron και glyphosate είναι δύο από τα ζιζανιοκτόνα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του τάτουλα και δρουν εμποδίζοντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Σε πειραματικά αποτελέσματα

του Deng το 2005 υπολογίσθηκε μείωση του χλωρού βάρους των ριζών του ζιζανίου σε ποσοστό 50%.

Παλαιότερα, το 1974 ο Janson μετά από εφαρμογή 2,4-D ή σε συνδυασμό με βιταμίνη K, παρατήρησε την πρόκληση αυξημένων νεκρώσεων στο φυτό κυρίως μετά τη χρήση του συνδυασμού των σκευασμάτων. Το trifluraline και το naptropamide είναι ζιζανιοκτόνα που συνιστά ο Sanseonics σε καλλιέργεια τομάτας στην Κροατία (1998).

Ο Cornes (1969) αναφέρει ότι το mesotrione εμφανίζει δράση κατά του τάτουλα σε καλλιέργεια καλαμποκιού είτε εφαρμόζεται προφυτρωτικά είτε μεταφυτρωτικά. Αποτελεσματική επίσης ήταν και η εφαρμογή του συνδυαστικά με το acetochlor (<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd>). Αξίζει να αναφερθεί ότι το mesotrione ως χημικό παράγωγο, έχει τις ρίζες του στο φυτό *Callistemon citrinus* της οικογένειας Myrtaceae στο οποίο διαπιστώθηκε η ύπαρξη συστατικού (αλληλοχημικού) με ζιζανιοκτόνο δράση.

Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ο ορθός τρόπος χρήσης των χημικών σκευασμάτων αφού δεν απουσιάζουν οι περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας. Σύμφωνα με αναφορές, η 1^η καταγραφή ανθεκτικότητας του ζιζανίου πραγματοποιήθηκε στην Ινδία το 1992 στην ομάδα των ζιζανιοκτόνων με τρόπο δράσης την παρεμπόδιση του φωτοσυστήματος II. Έρευνες δείχνουν την ύπαρξη ανθεκτικών βιότυπων τάτουλα στην ατραζίνη που εμφανίζουν διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Ωστόσο, δε θα πρέπει να παραβλεφθεί ο μειωμένος βαθμός προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών βιοτύπων του ζιζανίου στο περιβάλλον, γεγονός που εμποδίζει ως ένα βαθμό την εξάπλωσή τους (JianHua et al., 1999).

3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

3.1. Γενικά

Ο τάτουλας είναι κοσμοπολίτικο ζιζάνιο που φύεται στις περισσότερες θερμές περιοχές του κόσμου με εξαίρεση τις ορεινές (βουνά) και τα δάση (McKenna, 1989). Συναντάτε κοντά σε δρόμους, λιβάδια, καλλιεργούμενους ή εγκαταλελειμμένους αγρούς (Clark et al., 2005). Το όνομα στο ζιζάνιο δόθηκε από το Λινναίο, όπως αυτός το ανέφερε στο δημοσίευμα '*Species Plantarum*' το 1753. Το όνομα του γένους *datura* προέρχεται από τον αρχαίο ινδικό όρο dhatura ενώ το όνομα του είδους *stramonium* το οποίο σημαίνει «αγκάθι» απορρέει από τις ελληνικές «στρύχνος» (strychnos) και αλλόφρων (manikos) (www.ansci.cornell.edu/plants/jimsonweed/jimsonweed/html).

Σύμφωνα με πρόσφατη ταξινόμηση αναγνωρίζονται τέσσερις ποικιλίες του είδους: *D. stramonium* var. *stramonium* L., *D. stramonium* var. *tatula* L. Torr., *D. stramonium* var. *inermis* Jacq Timmerman και *D. stramonium* var. *godronii* Danert τα οποία για χρόνια θεωρούνταν από πολλούς βοτανολόγους ως διαφορετικά είδη (Berkov et al., 2006).

3.2. Ιστορική αναδρομή

Ο τάτουλας ανήκει στα δηλητηριώδη ζιζάνια, δηλαδή ζιζάνια που περιέχουν ουσίες σε χαμηλές συνήθως συγκεντρώσεις, με τοξικές επιδράσεις στα ζώα και τον άνθρωπο. Στοιχεία που μαρτυρούν τις τοξικές ιδιότητες του ζιζανίου προδίδουν τη μεγάλη ιστορική του διαδρομή. Ανθρωπολόγοι εντόπισαν ίχνη του σε αρχαιολογικά ευρήματα στο Νοτιοδυτικό Τέξας και το Μεξικό. Η εφαρμογή ραδιοχρονολόγησης με τη βοήθεια του άνθρακα (C-12) σε τοιχογραφίες, δείχνει την ύπαρξη του ζιζανίου 4000 χρόνια πριν.

Η Κλεοπάτρα, αναφέρεται ότι χρησιμοποιούσε τον τάτουλα για να σαγηνεύσει τον Καίσαρα. Το 38 μ.Χ. ο στρατός του Μάρκου Αντώνιου κατανάλωνε το φυτό καθώς επέστρεφε στο καταφύγιό του. Δε θα πρέπει ωστόσο να παραλείψουμε τις αναφορές του ζιζανίου στην 'Οδύσσεια' από τον Όμηρο και στα συγγράμματα του Shakespeare 'Ρωμέος και Ιουλιέτα' και 'Άμλετ' (Clark et al., 2005).

3.3. Χρήσεις

Στη Μεσαιωνική Ευρώπη και την Αγγλία, το διαβολόχορτο χρησιμοποιούνταν για τις επιδράσεις του στις λειτουργίες του εγκεφάλου (Busia & Heckels, 2006) αλλά και τις αφροδισιακές του ιδιότητες (Clark et al., 2005). Οι σπόροι του θρυμματιζόμενοι σε σκόνη είχαν βρει εφαρμογή για την ανακούφιση των πληγών από τους πόνους.

Το βότανο αυτό εμφανίζεται να έχει σημαντική θέση σε θρησκευτικές τελετές στην Ευρώπη. Η χρήση του ήταν σημαντική σε παγανιστικές τελετές (Busia & Heckels, 2006) ενώ οι Ινδουιστές το κάπνιζαν μαζί με κάνναβη σε παραδοσιακές τελετές. Στη θρησκεία των Βουντού το χρησιμοποιούσαν με τη μορφή της αλοιφής για την πραγματοποίηση του 'ορού της αλήθειας', όταν δυσκολευόντουσαν να αποφανθούν αν κάποιος λέει αλήθεια ή ψέματα (<http://en.wikipedia.org/wiki/Daturastramonim>).

Στις ιδιότητες του τάτουλα έχει τις ρίζες του ο μύθος για τις μάγισσες που «πετούν». Σύμφωνα με τον Renaissance (1450) οι γυναίκες τοποθετούσαν μια 'πράσινη αλοιφή' προερχόμενη από το συγκεκριμένο ζιζάνιο στα γενετικά όργανά τους με τη βοήθεια ενός ξύλου γεγονός που συνέβαλε στη δημιουργία του μύθου. Ωστόσο ο Laguna (1499-1560), θεραπευτής, διευκρίνισε το ρόλο του βοτάνου στη δημιουργία παραισθήσεων του μυαλού παρά μια φυσική ιπτάμενη ικανότητα (Busia & Heckels, 2006).

Παρόλα αυτά, η πρώτη αναφορά για τις τοξικές ιδιότητες του ζιζανίου και την πρόκληση συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε το 1676. Σήμερα, σημαντικός κρίνεται ο ρόλος των αλκαλοειδών που περιέχει το ζιζάνιο στη φαρμακευτική.

Ο τάτουλας είναι πλούσιος στα αλκαλοειδή ατροπίνη και σκοπολαμίνη που αποτελούν δευτερεύοντες μεταβολίτες. Η ισοιαμίνη είναι καθαρό εναντιομερές της ατροπίνης, ουσία που θεωρείται κατάλληλη για γαστροεντερικά προβλήματα ενώ η σκοπολαμίνη εμποδίζει τη ναυτία και τον εμετό (Talaty et al., 2005). Σύμφωνα με τον Hong και τους συνεργάτες του (2004) τα αλκαλοειδή που περιέχονται στο ζιζάνιο έχουν βρει εφαρμογή σε ασθένειες όπως Parkinson, έλκος στομάχου, διάρροια και βρογχικό άσθμα. Θα ήταν παράλειψη ωστόσο να μην αναφερθούν οι αρνητικές επιδράσεις που επιφέρει η κατανάλωσή του στην υγεία όπως είναι η υπέρταση ή υπόταση, αναπνευστικά προβλήματα, υπερθερμία (με τη θερμοκρασία να φθάνει τους 40-43°C) ικανή να σκοτώσει τα κύτταρα του εγκεφάλου ή να επιφέρει ακόμη και το

θάνατο. Αυτές οι ιδιότητες είναι που καθιστούν τον τάτουλα απαγορευμένο για τη φαρμακευτική και ο FDA αποφάσισε ότι είναι ακατάλληλο για κατανάλωση από τον άνθρωπο (http://en.wikipedia.org/wiki/Datura_stramonim).

Επίσης δε θα πρέπει να παραλειφθεί ο σημαντικός ρόλος του διαβολόχορτου σε μια νέα πρακτική, τη φυτοαποκατάσταση. Με τον όρο φυτοαποκατάσταση εννοείται κάθε σύστημα στο οποίο χρησιμοποιούνται φυτά είτε για τη μείωση και/ή το μηδενισμό των περιβαλλοντικών ρύπων σε εδάφη, ιζήματα ή νερά, είτε για να τους καταστήσουν ακίνδυνους (Λόλας, 2007). Αναφορά σ' αυτό το σπουδαίο ρόλο του ζιζανίου έκανε ο Bonde το 2001 ενώ οι Alarcon και Pinedo ένα χρόνο νωρίτερα, μετά από έρευνα δημοσίευσαν αποτελέσματα που φανερώνουν τη γρήγορη απομάκρυνση του 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) μετά από καλλιέργεια *D. stramonium* σε επιβαρυμένη περιοχή.

3.4. Ζημιές από το ζιζάνιο

3.4.1. Μείωση απόδοσης της καλλιέργειας

Η ικανότητα ανταγωνισμού για φως, νερό και θρεπτικά συστατικά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των ζιζανίων σε βάρος των καλλιεργειών με αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη και απόδοση αυτών (Montanya, 2006). Ο Cavero και οι συνεργάτες του το 1999 δημοσίευσαν αποτελέσματα εργασίας τους σε πειραματικό αγρό της Ισπανίας όπου διαπίστωσαν την αρνητική επίδραση του τάτουλα σε καλλιέργεια καλαμποκιού.

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα του Lehoczky και των συνεργατών του (2005) σε πείραμα ανταγωνισμού ζιζανίων στην καλλιέργεια του καλαμποκιού κατά την περίοδο άνοιξη-καλοκαίρι 2003. Αυτοί διαπίστωσαν ότι ο τάτουλας ήταν ένα από τα ζιζάνια που εμφάνιζαν τη μεγαλύτερη συχνότητα στην καλλιέργεια ενώ διαπιστώθηκε και η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ζιζανιοπληθυσμού και της περιεκτικότητας του εδάφους σε νερό.

Σημαντική κρίνει και η ομάδα του Scott (2000) την επίδραση του τάτουλα στην καλλιέργεια του βαμβακιού. Επισημαίνοντας την ιδιότητα του τάτουλα να μην μεταβάλει το ύψος του επηρεαζόμενο από την πυκνότητα αλλά και το μικρότερο ανάστημα του βαμβακιού σε σχέση με το ζιζάνιο τονίζει την ύπαρξη ανταγωνισμού

για φως. Με την παρέλευση 8 εβδομάδων από το φύτεμα του βαμβακιού παρατηρήθηκε μειωμένο ύψος καθώς η πυκνότητα του τάτουλα αυξήθηκε. Επιπλέον, πυκνότητα φυτών τάτουλα 1-32 παρουσίασε μείωση παραγωγής καψών του βαμβακιού, από 92 σε 60. Ο ανταγωνισμός δεν άφησε ανεπηρέαστο και το μήκος της ίνας σε συνθήκες αυξημένης βιομάζας και πυκνότητας του ζιζανιοπληθυσμού. Τέλος, βρέθηκε μείωση της παραγωγής κατά 10 και 25% για 0,5 και 1,5 φυτά τάτουλα, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες και σε αυτές εμφανίζεται σπουδαίος ο ρόλος του ζιζανίου από τους Montanya και Ponce (2006). Αρκεί να αναφερθεί η επίδρασή του στην παραγωγή καρπών, την ανάπτυξη και απορρόφηση αζώτου από φυτά τομάτας και πιπεριάς, με εκείνα της πιπεριάς να φέρονται περισσότερο ευάλωτα.

3.4.2. Τοξικές επιδράσεις σε ζώα και άνθρωπο

Το ζιζάνιο τάτουλας είναι ιδιαίτερα γνωστό για τις τοξικές του ιδιότητες, με τα τοξικά συστατικά να συγκεντρώνονται σε όλα τα μέρη του φυτού με ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις στα φύλλα και τους σπόρους. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην παρουσία αλκαλοειδών και κυρίως της ατροπίνης και σκοπολαμίνης με τη συγκέντρωση αυτών ανά φυτό να είναι 1,69-2,71mg/mL και 0,36-0,69mg/mL αντίστοιχα (Talaty et al., 2005). Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής αναφέρθηκαν περίπου 300 συμβάντα ανά έτος για τα έτη 1991-1993 ενώ αυτά αυξήθηκαν σε 500 για τα έτη 1994-1995 (Forrester, 2006). Δηλητηριάσεις, ακόμη και θάνατοι έχουν αναφερθεί και σε ζώα όπως κατσίκες, χοίρους, κότες μετά την κατανάλωση μολυσμένων δημητριακών με σπόρους του ζιζανίου (www.henriettesherbal.com/eclectic/usdisp/datura_stra.html) και άλογα μετά την κατανάλωση του ζιζανίου, ωστόσο σε μικρότερη έκταση σε σχέση με τον άνθρωπο (<http://en.wikipedia.org/wiki/Daturastramonim>). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην τάση των ζώων να καταναλώνουν δηλητηριώδη ζιζάνια μόνο στην περίπτωση που δεν υπάρχει άλλη τροφή αφού τα φυτά αυτά έχουν έντονη δυσάρεστη οσμή και ανεπιθύμητη γεύση (www.henriettesherbal.com/eclectic/usdisp/datura_stra.html).

3.4.3. Ξενιστές εντόμων-ασθενειών

Ο τάτουλας είναι ξενιστής εντόμων και ασθενειών που προκαλούν σοβαρά προβλήματα στις καλλιέργειες.

Μερικά από τα σημαντικότερα έντομα που το ξενίζουν είναι *Epitrix parvula* (Coleoptera, Chrysomelidae), *Lema trilineata* (Coleoptera, Chrysomelidae), *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera, Acrididae), *Manduca* sp. (Lepidoptera, Sphingidae) και είδος Noctuidae.

Το ζιζάνιο εμφανίζεται ευαίσθητο σε περισσότερους από 60 ιούς (Mountain, 1987). Μεταξύ των σημαντικότερων ιών που το προσβάλλουν είναι ο ιός του μωσαϊκού του αγγουριού (CMV), του κριθαριού (AMV) και ο ιός Y της πατάτας (PVY) (Ormeno et al. 2006; <http://image.fs.uidaho.edu/vide/famly124.htm#Datura%20stramonium>). Στην περίπτωση του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (TSWV) παρατηρήθηκε υψηλός βαθμός ανάπτυξης συμπτωμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες (Llamas et al., 1998).

3.4.4. Αλληλοπάθεια

Ο όρος αλληλοπάθεια προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις ‘άλληλο’ και σημαίνει ο ένας τον άλλο και τη λέξη ‘πάθος’ που σημαίνει πόνος (Oudhia, 2000) και αναφέρεται στην από μέρους ενός φυτού προσθήκη στο περιβάλλον του ενός ή περισσότερων χημικών ουσιών που παρεμποδίζουν ή θα παρεμποδίσουν την κανονική αύξηση – ανάπτυξη ενός άλλου φυτού στο ίδιο περιβάλλον (Λόλας, 2007). Ο τάτουλας είναι ένα ζιζάνιο που χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα της αλληλοπάθειας (Oudhia, 2000). Σπόροι πεσμένοι στο έδαφος απελευθερώνουν ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη άλλων φυτών στην ίδια περιοχή. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι σε στήλη χώματος στην οποία φύονταν το φυτό βρέθηκε ανθεκτικό στη μικροβιακή προσβολή για διάστημα 5 εβδομάδων (Levitt & Lovett, 1983). Όσον αφορά την επίδραση σε επίπεδο φυτών, στην Αυστραλία έχουν καταγραφεί αποτυχίες καλλιέργειας βάμβακος, σόργου και σόγιας σε αγρούς μολυσμένους με τάτουλα (Narwal, 1994).

Τοξική επίδραση του ζιζανίου, έχει επίσης παρατηρηθεί στη βλάστηση σπόρων ηλιάνθου σε όλους τους τύπους εδαφών, ωστόσο ο τύπος του εδάφους διαπιστώθηκε ότι καθορίζει το μέγεθος του προβλήματος. Πειραματικά αποτελέσματα έχουν δείξει την παραμονή φυτοτοξικότητας σε έδαφος που περιέχει

καολινίτη και ιλλίτη για 20 εβδομάδες και για 8 εβδομάδες σε αργιλούχο έδαφος σε ελεγχόμενες συνθήκες (Levitt & Lovett, 1983).

3.5. Μοριακή ανάλυση

Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση και καταγραφή των γενετικών αποστάσεων βασίζεται στην ύπαρξη πολυμορφικών αλληλουχιών στο γένωμα των πληθυσμών. Με τον όρο πολυμορφική αλληλουχία νοείται η αλληλουχία DNA, η οποία μπορεί να απουσιάζει από κάποιους γενότυπους ή να εμφανίζεται σε κάποιους άλλους. Με βάση λοιπόν την αναλογία πολυμορφικών αλληλουχιών στο μοριακό πρότυπο διαφόρων γενοτύπων, είναι εφικτή η *in silico* σύγκρισή τους με αποτέλεσμα την κατασκευή μητρών ομοιότητας (Jaccard, Dice). Ακολουθεί χρήση κατάλληλων αλγορίθμων όπως οι UPGMA και Neighbor Join, οι οποίοι συγκρίνουν το βαθμό ομοιότητας των μητρών που θα προκύψουν. Τα αποτελέσματα συμβάλλουν στον καθορισμό των γενετικών αποστάσεων και κατ' επέκταση στην εκτίμηση του βαθμού συγγένειας των γενοτύπων.

Η ανάπτυξη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι αυτή που μας επιτρέπει τη μελέτη του γενώματος κάθε ατόμου. Ο ρόλος της έγκειται στην αντιγραφή επιλεκτικά, για εκατομμύρια φορές, ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η τεχνική αυτή που προτάθηκε από τον Mullis (βραβείο Nobel 1992) και άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1985, έχει αυξήσει την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ποικιλία μοριακών δεικτών όπως είναι ο AFLP, SNP, RFLP, SSR, RAPD, κ.ά. με τους δύο τελευταίους να μας απασχολούν στη συγκεκριμένη εργασία. Ο χρήσιμος μοριακός δείκτης SSR (Simply Sequence Repeat) ευρύτερα γνωστός ως 'μικροδορυφόροι' χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα καθώς και συγκυρίαρχη κληρονομικότητα. Η λειτουργία του βασίζεται στην ύπαρξη διαδοχικών επαναλήψεων μικρών (2-6 βάσεις) τμημάτων DNA που βρίσκονται μεταξύ διατηρημένων περιοχών (Litt & Luty, 1989).

Στην περίπτωση του δείκτη RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) πραγματοποιείται γρήγορα και με σχετικά χαμηλό κόστος, ο έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Θεωρητικά υπάρχει ανεξάντλητη ποικιλία RAPD δεικτών καθώς η ακολουθία τους επιλέγεται τυχαία. Η χρήση του ενδείκνυται για τη μέτρηση

γενωμικής παραλλακτικότητας σε ένα πληθυσμό (Williams et al., 2001). Το σοβαρότερο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η μικρή επαναληψιμότητα που εμφανίζουν τα αποτελέσματα λόγω της τυχαίας επιλογής των πολυμορφικών περιοχών καθώς και ο ημικυρίαρχος τύπος κληρονομικότητάς του. Το πρόβλημα της επαναληψιμότητας μπορεί να ξεπεραστεί τόσο με την εφαρμογή πολλών επαναλήψεων και επιλογή των ισχυρά πολυμορφικών περιοχών όσο και με το συνδυασμό των δεδομένων της RAPD ανάλυσης με δεδομένα από την ανάλυση και άλλων μοριακών δεικτών. Το δεύτερο μειονέκτημα σχετίζεται με τον τύπο κληρονομικότητας που εμφανίζουν οι RAPD δείκτες και μπορεί να ξεπεραστεί με την αναβάθμιση και μετατροπή τους στους κυρίαρχους μοριακούς δείκτες τύπου SCAR's.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Γενικά

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο, την περίοδο άνοιξη-φθινόπωρο 2006, στο Εργαστήριο Ζιζανιολογίας το χειμώνα του 2006 και στο Εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης των Φυτών το φθινόπωρο του ίδιου έτους. Στο Εργαστήριο Ζιζανιολογίας μελετήθηκαν οι συνθήκες βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα σε δύο φωτοπεριόδους και δύο θερμοκρασίες και έγινε η αξιολόγηση εννέα ζιζανιοκτόνων για τον χημικό έλεγχο του τάτουλα. Τα ίδια ζιζανιοκτόνα όπως και ο βιολογικός κύκλος και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ζιζανίου μελετήθηκαν σε συνθήκες αγρού. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, συλλέχθηκαν από το Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου το έτος 2003 και την περιοχή της Νίκαιας το έτος 2005. Στο Εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης των Φυτών διεξάχθηκε η μοριακή ανάλυση των έξι βιοτύπων τάτουλα και των τεσσάρων αγριομελιτζάνας.

4.2. Βιολογία τάτουλα

Η μελέτη της βιολογίας του τάτουλα αφορούσε α) τη βλαστικότητα του σπόρου σε συνθήκες εργαστηρίου και β) τον χρόνο εμφάνισης των σημαντικότερων σταδίων ανάπτυξης του ζιζανίου στον αγρό.

4.2.1. Πείραμα στο εργαστήριο

Σκοπός του πειράματος, ήταν η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών διακοπής του λήθαργου και η βλάστηση των σπόρων. Η συλλογή των καρπών έγινε τον Οκτώβριο του 2003 από το Βελεστίνο και τον ίδιο μήνα του 2005 από τη Νίκαια. Αφού οι καρποί ξεράθηκαν αφαιρέθηκαν οι σπόροι. Το χρώμα του σπόρου ήταν σκούρο μαύρο, νεφροειδούς σχήματος με σκληρό περισπέρμιο.

Η βλαστικότητα των σπόρων του τάτουλα μελετήθηκε σε θάλαμο βλάστησης ελεγχόμενης ατμόσφαιρας ως προς τη θερμοκρασία και το φωτισμό στις συνθήκες:

- ⓐ Θερμοκρασία: 15 και 25°C
- ⓑ Φωτοπερίοδο: 24h σκότος και 16h φως/ 8h σκοτάδι.

Στις συνθήκες αυτές αξιολογήθηκαν τέσσερις επεμβάσεις:

- ✚ Τρίψιμο σπόρου με γυαλόχαρτο (για μείωση του όγκου του περισπερμίου περίπου 2.5%) και γιββεριλλικό οξύ 1mg/mL στο υπόστρωμα.
- ✚ Τρίψιμο σπόρου με γυαλόχαρτο και γιββεριλλικό οξύ 0,5mg/mL στο υπόστρωμα.
- ✚ NKO_3 0,2% στο υπόστρωμα.
- ✚ Εμβάπτιση του σπόρου σε H_2SO_4 για 20min και ξέπλυμα με νερό και γιββεριλλικό οξύ 0,5mg/mL στο υπόστρωμα..

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά τριβλία petri. Σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί και πάνω σε αυτό 10 σπόροι τάτουλα, οι οποίοι προηγουμένως είχαν δεχθεί ορισμένη μεταχείριση. Ακολούθησε διαβροχή με 6mL απεσταγμένο νερό ή GA_3 ή KNO_3 ανάλογα με την επέμβαση. Έπειτα τα τριβλία συνοδευόμενα με κατάλληλη σήμανση, μεταφέρθηκαν στο θάλαμο βλάστησης (Σχήμα 1). Απεσταγμένο νερό προσθέτονταν όποτε κρίνονταν απαραίτητο ώστε να διατηρείται η απαραίτητη υγρασία για τη βλάστηση των σπόρων.

Κάθε 3-5 ημέρες καταγράφονταν ο αριθμός των σπόρων που βλάστεινε σε κάθε τριβλίο. Η διατήρηση των τριβλίων στους θαλάμους διήρκεσε 25-30 ημέρες. Κάθε επέμβαση είχε τρεις επαναλήψεις ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε θερμοκρασία.



Σχήμα 1. Θάλαμος βλάστησης.

4.2.2. Πείραμα αγρού

Για τη μελέτη του βιολογικού κύκλου του ζιζανίου του τάτουλα, σπορά πραγματοποιήθηκε στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στις 12 Μαΐου. Σπάρθηκαν τέσσερις γραμμές μήκους 2m με πέντε θέσεις σποράς ανά γραμμή και βάθος 2cm οι οποίες απείχαν μεταξύ τους 0,5m. Κατόπιν ακολούθησε πότισμα με τεχνητή βροχή για καλύτερη επαφή του σπόρου με τη σποροκλίνη. Η άρδευση γινόταν όποτε κρίνονταν απαραίτητο ενώ παράλληλα απομακρύνονταν τα υπόλοιπα ζιζάνια για τη διευκόλυνση της αύξησης χωρίς ανταγωνισμό και καλύτερη μελέτη του τάτουλα.

Για τη μελέτη της βιολογίας παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν ορισμένα στάδια ανάπτυξης του ζιζανίου και του χρόνου εμφάνισης των σταδίων αυτών, σε ημέρες από τη σπορά. Για την περιγραφή των σταδίων ανάπτυξης του τάτουλα χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα B.B.C.H., συντομογραφία προερχόμενη από τα ινστιτούτα B.B.A., B.S.A. και I.V.A., τα οποία από κοινού ανέπτυξαν αυτή την κλίμακα.

Η κλίμακα B.B.C.H. είναι ένα σύστημα για μια ομοιόμορφη κωδικοποίηση των φαινοτυπικά ίδιων σταδίων ανάπτυξης από όλα τα μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά, βασιζόμενη στο γνωστό κώδικα των δημητριακών του Zadoks και των συνεργατών του (1974). Η B.B.C.H. κλίμακα είναι ένα δεκαδικό σύστημα με δέκα βασικά στάδια ανάπτυξης και πάνω από δέκα δευτερεύοντα, αρχίζοντας από το φύτρωμα των σπόρων (στάδιο 0) και φθάνοντας ως το γήρας (στάδιο 90). Το σύστημα αυτό εξελίχθηκε και προσαρμόστηκε στα ζιζάνια ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε έρευνα της ανάπτυξης των φυτών αυτών (Hess et al., 1997). Τα στάδια που καταγράφηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Τα στάδια ανάπτυξης που παρακολουθήθηκαν στη μελέτη βιολογίας του τάτουλα σύμφωνα με την κλίμακα B.B.C.H.

Κωδικός σταδίου	Περιγραφή
0	Σπορά
10	Εμφάνιση κοτυληδόνων
11	1ο φύλλο
13	3ο φύλλο
15	5ο φύλλο
31	1ο Μ.Δ.
33	3ο Μ.Δ.
35	5ο Μ.Δ.
51	Εναρξη έκπτυξης άνθους
59	Πλήρης έκπτυξη άνθους
71	Εμφάνιση καρπών
81	Έναρξη ωρίμανσης καρπού
89	Πλήρης ωρίμανση καρπού
97	Ολοκλήρωση βιολογικού κύκλου

4.3. Μορφολογία τάτουλα

Για τη μελέτη της βιολογίας του ζιζανίου στον πειραματικό αγρό ορίσθηκαν τα διάφορα μορφολογικά γνωρίσματα του τάτουλα. Ίδιες μετρήσεις έγιναν και σε αυτοφυή φυτά καθιστώντας το δείγμα πιο αντιπροσωπευτικό. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Μετρήσεις μορφολογικών χαρακτηριστικών του ζιζανίου *D. stramonium*.

Μέρος του φυτού	Μέτρηση
Κοτυληδόνες	Σχήμα κοτυληδόνων
Φύλλα	Διαστάσεις 1ου πραγματικού φύλλου
Άνθος	Χρώμα άνθους Διαστάσεις άνθους
Βλαστός	Χρώμα βλαστού Μήκος 1ου, 3ου, 5ου μεσογονάτιου διαστήματος
Καρπός	Τελικό ύψος φυτού Αριθμός σπόρων/ κάψα Βάρος σπόρου

4.4. Χημική αντιμετώπιση του ζιζανίου τάτουλα

Η μελέτη της χημικής αντιμετώπισης του τάτουλα, έγινε με την εφαρμογή εννέα ζιζανιοκτόνων εκ των οποίων τα έξι εφαρμόστηκαν προφυτρωτικά (PRE), ένα προσπαρτικά ενσωματούμενο (PPI) και δύο μεταφυτρωτικά (POST). Η επιλογή έγινε με βάση τη βιβλιογραφία αλλά και την κυκλοφορία τους στην Ελλάδα. Η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες αγρού αλλά και στο Εργαστήριο, σε φυτοδοχεία.

Τα ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν προφυτρωτικά ήταν, τα aclonifen (Challenge 60SC), acetochlor (Harness 84EC), isoxaflutole (Merlin 75WG), dimethenamid (Spectrum 72EC), mesotrione (Callisto 10SC)+ acetochlor και napropamide (Devrinol 45SC). Προσπαρτικά με ενσωμάτωση εφαρμόστηκε το trifluralin (Τριφονίλ 48EC) ενώ μεταφυτρωτικά τα mesotrione (Callisto 10SC) και imazamox (Pulsar 40SL). Ο χρόνος και η δόση εφαρμογής φαίνονται στον Πίνακα 3.4.4.1. Ζιζανιοκτόνα μελέτης

mesotrione (Callisto 10SC): Ανήκει στην οικογένεια των τρικετονών. Τα συμπτώματα από την εφαρμογή του σε ευαίσθητα φυτά είναι λεύκανση που ακολουθείται από νέκρωση μέσα σε 3-5 ημέρες. Ο μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων αυτής της οικογένειας, είναι ότι παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου υδροξυφαινυλπυρουβική διοξυγενάση (4-HPPD) κατά τη σύνθεση των καροτενοειδών. Απορροφάται γρήγορα από τις ρίζες και το φύλλωμα και μετακινείται μέσα σε όλα τα μέρη του φυτού.

Το mesotrione κυκλοφορεί στην Ελλάδα από το 2002 με το εμπορικό όνομα Callisto 10SC. Χρησιμοποιείται είτε ως προφυτρωτικό είτε ως μεταφυτρωτικό για έλεγχο κυρίως πλατύφυλλων ζιζανίων, όπως βλήτα, αγριοβαμβακιά, αγριομελιτζάνα, τάτουλας και μερικών αγρωστωδών ζιζανίων στο καλαμπόκι όπως μουχρίτσα, αιματόχορτο (Vencil, 2002).

dimethenamid (Spectrum 72EC): Ανήκει στα χλωροακεταμίδια. Απορροφάται από το κολεόπιλο, η δραστηριότητα του οποίου πρακτικά διακόπτεται μετά την εφαρμογή του σκευάσματος σε σπόρους, ρίζες ή σπορόφυτα. Ο μηχανισμός δράσης του πιστεύεται ότι είναι η παρεμπόδιση σύνθεσης μιας μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων.

Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Spectrum 72EC, υγρό γαλακτωματοποιήσιμο, με συνιστώμενη δόση 125-140 cm³/στρ. Είναι ζιζανιοκτόνο

που χρησιμοποιείται για ετήσια αγρωστώδη και ορισμένα πλατύφυλλα, σε καλλιέργεια καλαμποκιού. Καταπολεμά αιματόχορτο, μουχρίτσα, σετάρια, αντράκλα, βλήτα και αγριοτομάτα. Εφαρμόζεται προφυτρωτικά του καλαμποκιού, χωρίς ενσωμάτωση με την προϋπόθεση ότι θα πέσουν στο χωράφι τουλάχιστον 10 mm νερού (με βροχή ή πότισμα) μέσα στις επόμενες 10 ημέρες. Γίνεται ψεκασμός του εδάφους χωρίς ενσωμάτωση, με όγκο ψεκαστικού υγρού 50 L/ στρ. Τελευταία επέμβαση πριν από τη συγκομιδή, 30 ημέρες. Δεν είναι φυτοτοξικό στις συνιστώμενες χρήσεις και δόσεις

imazamox (Pulsar 40SL): Ανήκει στις ιμιδαζολινόνες. Δρα εμποδίζοντας τη βιοσύνθεση διακλαδιζόμενων αμινοξέων ή τη δράση του ενζύμου ALS. Είναι διασυστηματικό, μεταφυτρωτικό, ζιζανιοκτόνο με δράση από το φύλλωμα και το έδαφος για τον έλεγχο ετήσιων πλατύφυλλων ζιζανίων στη μηδική. Έγκριση κυκλοφορίας στην Ελλάδα πήρε το 2006. Ελεγχόμενα ζιζάνια είναι η αγριοντοματιά, βλήτα, λουβουδιά, αγριοβαμβακιά, τάτουλας, καψέλλα.

Το ζιζανιοκτόνο απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών και μετακινείται στους μεριστοματικούς ιστούς δια μέσου του συμπλάστη και του αποπλάστη. Η δράση του από φυλλώματος εκδηλώνεται μέσα σε λίγες ημέρες από την εφαρμογή του με αναστολή της αύξησης των φυτών, χλώρωση και νέκρωση των μεριστωματικών ιστών. Η νέκρωση όμως των φυτών επέρχεται μετά από εβδομάδες. Η δράση του από το έδαφος εκδηλώνεται λίγες ημέρες μετά το φύτευμα των ζιζανίων με αναστολή της αύξησης, ενώ η νέκρωσή τους επέρχεται πολύ αργότερα.

Η εφαρμογή του συνιστάται σε δόση 125cm³/στρ μαζί με 400g θειϊκής αμμωνίας. Τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή προτείνεται να είναι το διάστημα των 28 ημερών.

Στον αγρό που χρησιμοποιήθηκε το ζιζανιοκτόνο, μπορούν να σπαρούν την ίδια καλλιεργητική περίοδο, φασόλια, μπιζέλια ή σόγια, μετά από βαθιά άροση. Δεν πρέπει να σπέρνονται σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη, ρεβίθια, ηλίανθος ή καπνός πριν περάσουν 4 μήνες, καλαμπόκι, βαμβάκι, πατάτα ή ρύζι πριν περάσουν 9 μήνες και ζαχαρότευτλα ή ελαιοκράμβη πριν περάσουν 12 μήνες από την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου. Το imazaxon είναι πολύ τοξικό για υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον.

trifluralin (Τριφονίλ 48EC): Ανήκει στις δινιτροανιλίνες εμποδίζοντας το σχηματισμό της πυρηνικής ατράκτου κατά την κυτταροδιαίρεση. Η εφαρμογή του ενδείκνυται κατά αγρωστωδών ζιζανίων όπως η αλεπονουρά, το αιματόχορτο, η

μουχρίτσα και ο βέλιουρας. Σημαντική κρίνεται η αποτελεσματικότητα του και κατά πλατύφυλλων ζιζανίων όπως η λουβουδιά, η στελάρια, το τριβόλι και τα βλήτα. Χρησιμοποιείται σε καλλιέργεια βάμβακος, ηλίανθου, καρότων κ.ά. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η δόση εφαρμογής ποικίλει ανάλογα με το έδαφος. Συγκεκριμένα για ελαφρά εδάφη είναι 120cm³/στρ, για μέσα 170-200cm³/στρ και για βαρεία 250cm³/στρ.

napropamide (Devrinol 45SC): Ανήκει στην οικογένεια των αμιδίων. Πήρε έγκριση κυκλοφορίας το 1972. Το χημικό του όνομα είναι το N,N-diethyl-2-(1-naphthalenyloxy)propamide (Edwards, 2005). Εφαρμόζεται προφυτρωτικά για την αντιμετώπιση πλατύφυλλων αλλά και ετήσιων ζιζανίων σε δενδρώδεις καλλιέργειες εσπεριδοειδών, ξηρών καρπών, λαχανικά (μελιτζάνες, τομάτες), καπνό και δασικές εκτάσεις (Esau, 2000). Συνιστάται η αποφυγή εφαρμογής του σε εδάφη με οργανική ουσία >10%. Η δράση του σχετίζεται με παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των ριζικών κυττάρων διακόπτοντας έτσι την ανάπτυξη φυταρίου.

Όσον αφορά την εφαρμογή του, αυτή θα πρέπει να είναι προσεκτική αφού κρίνεται επικίνδυνο για την υγεία. Έρευνες για την επίδρασή του σε σκύλους και ποντίκια απέδειξαν τη μείωση του σωματικού βάρους των ζώων με σημαντικότερες τις επιδράσεις να εστιάζονται στα θηλυκά άτομα σε σύγκριση με τα αρσενικά (Edwards, 2005).

acetochlor (Harness 84EC): Ανήκει στην ομάδα των αμιδίων και πιο συγκεκριμένα των χλωροακεταμιδίων. Είναι προφυτρωτικό ή προσπαρτικό, για τον έλεγχο κυρίως των ετήσιων αγρωστωδών και ορισμένων πλατύφυλλων ζιζανίων. Χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες καλαμποκιού (όλοι οι τύποι), σόγιας, πατάτας, αραχίδας και ηλίανθου. Μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα με atrazine ή terbuthylazine στην καλλιέργεια του αραβοσίτου για έλεγχο ευρύτερου φάσματος ζιζανίων.

Εφαρμόζεται κυρίως στο έδαφος, από όπου δεν αναστέλλει το φύτεμα των σπόρων των ζιζανίων, αλλά παρεμβαίνει στη διαίρεση των κυττάρων τους. Αποτέλεσμα αυτού του τρόπου δράσης, είναι η αναστολή της αύξησης των νεαρών φυτών τους και ειδικότερα της επιμήκυνσης της ρίζας τους (Vasilakoglou and Eleftherohorinos 1997).

Ο Anderson (1996) αναφέρει ότι το acetochlor απορροφάται ευκολότερα από τους βλαστούς παρά από τις ρίζες των νεαρών φυτών. Η χαμηλή εδαφολογική υγρασία έχει μικρή επιρροή στην αποτελεσματικότητά του. Η κύρια μέθοδος

διάσπασης είναι η μικροβιακή διάσπαση. Οι απώλειες λόγω φωτοδιάσπασης είναι αμελητέες. Παραμένει στο έδαφος από 8 έως 12 εβδομάδες, αλλά ο χρόνος μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον εδαφολογικό τύπο και τις κλιματολογικές συνθήκες.

Όσον αφορά την τοξικότητα του, έπειτα από πειράματα σε αρουραίους για 90 ημέρες, σε διαιτητικό επίπεδο 800 ppm, κανένα σημαντικό τοξικολογικό αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε (Herbicide Handbook, 1983).

isoxaflutole (Merlin 75WG): Ανήκει στην οικογένεια των ισοξαζολιδινών. Τα συμπτώματα από την εφαρμογή του σε ευαίσθητα φυτά είναι λεύκανση (μείωση της βιοσύνθεσης των καρετινοειδών) που ακολουθείται από νέκρωση μέσα σε 3-5 ημέρες. Ο μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων αυτής της οικογένειας είναι ότι παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου υδροξυφαινυλπυρουβική διοξυγενάση (4-HPPD), το οποίο είναι απαραίτητα κατά τη βιοσύνθεση της πλαστοκινίνης (Ελευθεροχωρινός, 2002).

Συνιστάται προφυτρωτικά ή νωρίς μεταφυτρωτικά για αντιμετώπιση αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων στον αραβόσιτο. Το isoxaflutole απορροφάται από τη ρίζα ή τα φύλλα και εκδηλώνει διασυστηματική δράση. Αποτέλεσμα του μηχανισμού δράσης του (αναστολέας του ενζύμου υδροξυφαινυλπυρουβική διοξυγενάση) είναι η εμφάνιση των προαναφερθέντων τοξικών συμπτωμάτων στα ευαίσθητα ζιζάνια μετά το φύτευμά τους. Η εκλεκτική του δράση οφείλεται στην ικανότητα μεταβολισμού του από τα φυτά του αραβόσιτου. Στον αραβόσιτο συνιστάται η εφαρμογή του σε δόση 10-13g/στρ. Απομακρύνεται από το έδαφος μέσω της χημικής υδρόλυσης και της μικροβιακής αποσύνθεσης (Hatzios, 1998). Η υπολειμματική του διάρκεια στο έδαφος κυμαίνεται από 2 μέχρι 4 μήνες. Σε περίπτωση αποτυχίας της καλλιέργειας, στην οποία εφαρμόστηκε, μπορεί να ξανασπαρεί αραβόσιτος ή πατάτα, αφού προηγηθεί ένα καλό όργωμα. Το isoxaflutole και οι μεταβολίτες του παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα συγκράτησης από τα κολλοειδή του εδάφους, γι' αυτό και η πιθανότητα έκπλυσής του είναι αυξημένη.

aclonifen (Challenge 60SC): Πρώτη έγκριση στη χώρα μας το 1999. Ανήκει στην οικογένεια των διφαινυλαιθέρων. Προφυτρωτικό για έλεγχο πλατύφυλλων κυρίως αλλά και συνηθισμένων αγρωστωδών στην Ελλάδα σε καπνό, ενώ αλλού σε καλαμπόκι, σιτάρι, πατάτα και διάφορα λαχανικά. Στον καπνό, η εφαρμογή του συνιστάται να γίνει σε δόση 350cm³/στρ ή 250cm³/στρ ενώ στην καλλιέργεια της πατάτας 400-450cm³/στρ 50 ημέρες πριν τη συγκομιδή.

Στο φυτό απορροφάται από το υποκοτύλιο και τις κοτυληδόνες ή το κολεόπτιλο στα αγρωστώδη και μετακινείται αποπλαστικά και συμπλαστικά. Μεταβολίζεται γρήγορα με υδροξυλίωση και στους δύο δακτύλιους. Δεν εκπλύνεται. Παρεμβαίνει στη σύνθεση καροτενοειδών χωρίς ακόμα να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα μετά την εφαρμογή του είναι η λεύκανση. Στο έδαφος αποσυνθέτονται από τους μικροοργανισμούς σχετικά εύκολα και γρήγορα (Λόλας, 2007).

4.4.2. Πείραμα στον αγρό

Πειραματικό σχέδιο

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν οι πλήρεις τυχαιοποιημένες ομάδες (Randomized Complete Blocks-RCB), με τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Η τυχαιοποίηση των επεμβάσεων στα πειραματικά τεμάχια έγινε με τη βοήθεια στατιστικών πινάκων (Φασούλας, 1992).

Εγκατάσταση στον αγρό

Η εγκατάσταση του πειράματος στον αγρό πραγματοποιήθηκε στις 12 Μαΐου. Κάθε πειραματικό τεμάχιο είχε διαστάσεις 2x2m, περιελάμβανε έξι γραμμές σποράς, δύο για κάθε βιότυπο του ζιζανίου, με 10 θέσεις σποράς η κάθε μία και ένα σπόρο ανά θέση. Οι θέσεις σποράς οριοθετήθηκαν με κατάλληλα ξύλινα καλαμάκια προκειμένου να είναι εντοπισμένη η θέση του ζιζανίου.

Η εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε ψεκασμός των προφυτρωτικών και προσπαρτικών ενσωματούμενων ζιζανιοκτόνων με ψεκαστήρα χειρός. Η εφαρμογή έλαβε χώρα στις 12 Μαΐου. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ψεκασμός των μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων στις 17 Ιουνίου, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο του τέταρτου με πέμπτου (4-5) πραγματικού φύλλου. Η δόση για κάθε σκεύασμα υπολογίστηκε για έκταση 4m².

Ο αγρός αρδεύονταν δύο με τρεις φορές την εβδομάδα και απομακρύνονταν τα διαφορετικά από τον τάτουλα ζιζάνια όποτε κρίνονταν απαραίτητο.

Η αποτελεσματικότητα των προφυτρωτικών και μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων, κατά του τάτουλα, εκτιμήθηκε μακροσκοπικά ως επί τοις εκατό έλεγχος σε κάθε πειραματικό τεμάχιο, που είχε δεχθεί ζιζανιοκτόνο σε σχέση με το μάρτυρα.

4.4.3. Πείραμα στο εργαστήριο

Πειραματικό σχέδιο

Όπως και στον αγρό, το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις Τυχαιοποιημένες Ομάδες (Randomized Complete Blocks-RCB), με τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση.

Εγκατάσταση στα φυτοδοχεία

Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε συλλέχθηκε από το Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου στο Βελεστίνο, το οποίο μετά το θρυμματισμό του, τοποθετήθηκε σε φυτοδοχεία στο Εργαστήριο Ζιζανιολογίας. Ο πράσινος με τον κόκκινο βιότυπο με προέλευση τη Νίκαια σπάρθηκαν στο ίδιο φυτοδοχείο με τρεις σπόρους ανά βιότυπο. Ο πράσινος με προέλευση το Βελεστίνο βιότυπος σπάρθηκε σε χωριστά φυτοδοχεία, με πέντε σπόρους ανά φυτοδοχείο. Η σπορά στα φυτοδοχεία έγινε στις 8 Μαΐου, στην πρώτη πραγματοποίηση του πειράματος, και στις 16 Ιουλίου, στην επανάληψη του πειράματος. Την ίδια ημέρα της σποράς, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή των προφυτρωτικών και προσπαρτικών ζιζανιοκτόνων ενώ τα μεταφυτρωτικά ψεκάστηκαν 31 Μαΐου και 8 Αυγούστου, αντίστοιχα.

Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ζιζανιοκτόνο στα πειράματα του εργαστηρίου, υπολογίστηκαν για έκταση 0,0075m² που είναι το εμβαδό από τα φυτοδοχεία (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Χρόνος εφαρμογής και συνιστώμενες δόσεις ζιζανιοκτόνων.

Ζιζανιοκτόνο	Χρόνος εφαρμογής	Σκεύασμα (g ή mL/στρ)
Challenge 60SC	PRE	350mL
Harness 84EC	PRE	250mL
Merlin 75WG	PRE	12g
Callisto 10SC	POST	75mL
Spectrum 72EC	PRE	125mL
Callisto 10SC + Harness 84EC	PRE	37,5mL + 125mL
Devrinol 45SC	PRE	300mL
Τριφονίλ 48EC	PPI	350mL
Pulsar 40SL	POST	125mL + 400g Θεϊκή αμμωνία

4.5. Μοριακή ανάλυση βιοτύπων τάτουλα και αγριομελιτζάνας

Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διερευνήθηκε η φυλογενετική σχέση και η γενετική απόσταση ενός βιότυπου καλλωπιστικού τάτουλα με πέντε βιότυπους του ζιζανίου (Πράσινος με προέλευση το Βελεστίνο, Πράσινος Νίκαια, Πράσινος Λάρισα, Κόκκινος Νίκαια και Κόκκινος Λάρισα) και τέσσερις βιότυπους αγριομελιτζάνας, *Xanthium strumarium* (Πράσινος Νίκαια, Πράσινος Λάρισα, Κόκκινος Νίκαια και Κόκκινος Λάρισα) (Πίνακες 4 και 5), με ποικίλα μορφολογικά χαρακτηριστικά και γεωγραφική προέλευση, διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας. Στόχος ήταν η εκτίμηση της φυλογενετικής σχέσης και των γενετικών αποστάσεων με εφαρμογή των μοριακών δεικτών Simple Sequence Repeat (SSR) και Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

Πίνακας 4. Βιότυποι *D. stramonium* και σύνολο δειγμάτων γενώματος.

Βιότυπος	Αριθμός δειγμάτων
Πράσινος-Βελεστίνο	7
Πράσινος-Νίκαια	7
Πράσινος-Λάρισα	1
Κόκκινος-Νίκαια	7
Κόκκινος-Λάρισα	1
Καλλωπιστικός	7
Σύνολο	30

Πίνακας 5. Βιότυποι *X. strumarium* και σύνολο δειγμάτων γενώματος.

Βιότυπος	Αριθμός δειγμάτων
Πράσινος-Νίκαια	1
Πράσινος-Λάρισα	1
Κόκκινος-Νίκαια	1
Κόκκινος-Λάρισα	1
Σύνολο	4

4.5.1. Απομόνωση DNA

Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε από φύλλα φυτών νεαρής ηλικίας (2^ο -4^ο πραγματικό φύλλο). Συνολικά απομονώθηκε γενετικό υλικό από 30 δείγματα τάτουλα και τέσσερα δείγματα αγριομελιτζάνας με τη μικρομέθοδο CTAB (βλ. Παράρτημα: Απομόνωση ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB). Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε μείγμα ιστών νεαρών, υγιών φύλλων βάρους περίπου 0,3g. Το απομονωμένο DNA σε όλες τις περιπτώσεις διαλύθηκε σε 200μL TE διαλύματος (10mM Tris-HCl, 1mM Na₂EDTA, pH 8.0). Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA οπτικά σε πηκτή αγαρόζης (0,7%) και χρήση πρότυπων διαλυμάτων του πλασμιδίου λ. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων υπολογίστηκε στα 50ng/μL.

(i) Μοριακή ανάλυση με χρήση εκκινητών τύπου SSR's

Για την ανάλυση των πολυμορφισμών που εντοπίστηκαν στο γενετικό υλικό των δειγμάτων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν πέντε ζεύγη εκκινητών SSR (Πίνακας 6). Κάθε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης περιελάμβανε 100 ng γενωμικού DNA ως μήτρα, 2.5μL 10xPCR buffer, 1.5μL MgCl₂, 2μL dNTPs, 0.4μL της κάθε απλής αλυσίδας του SSR εκκινητή και 0.5U Taq DNA πολυμεράσης ενώ η αντίδραση ρυθμίστηκε στα 25μL τελικό όγκο με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Οι συνθήκες της αντίδρασης συνοψίζονται στον Πίνακα 7 με τη θερμοκρασία επανυβριδισμού να μεταβάλλεται από 38-40°C.

Πίνακας 6. Αλληλουχία εκκινητών SSR που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Εκκινητής	Αλληλουχία
LEgt001(TMS42)	F: 5'-AGAATTTTTTCATGAAATTGTCC-3' R: 5'-TATTGCGTTCCTCCCTCT-3'
LEga004(TMS33)	F: 5'-AGCATGGGAAGAAGACACGT-3' R: 5'-TTGAGCAAAACATCGCAATC-3'
LEta012(AQ368062)	F: 5'-TGATCCTAAGCTTTTCCGTGAGT-3' R: 5'-CAAGTTCACCTCATTTACCCCT-3'
LEat015(TMS23)	F: 5'-GGATTGTAGAGGTGTTGTTGG-3' R: 5'-TTTGTAATTGACTTTGTTCGATG-3'
LEct004(TMS29)	F: 5'-AGCCACCCATCACAAAGATT-3' R: 5'-GTCGCACTATCGGTCACGTA-3'

Πίνακας 7. Συνθήκες του προγράμματος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης κατά SSR

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	6	-
Αποδιάταξη	94	0.50	-
Επανυβριδισμός	40	0.50	35
Επέκταση	72	0.50	-
Τελική Επέκταση	72	8	-

(ii) Μοριακή ανάλυση με χρήση εκκινητών τύπου RAPD's

Στην περίπτωση του RAPD μοριακού δείκτη χρησιμοποιήθηκαν έξι δεκαμερείς εκκινητές (Πίνακας 8). Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης ήταν

και πάλι τελικού όγκου 25μL αποτελούμενη από 100 ng γενωμικού DNA ως μήτρα, 2.5μL 10xPCR buffer, 1.5μL MgCl₂, 2μL dNTPs, 4μL από 10-νουκλεοτιδικό RAPD εκκινητή και 0.5U Taq DNA πολυμεράση. Οι συνθήκες της αντίδρασης παραθέτονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 8. Αλληλουχία εκκινητών RAPD που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Εκκινητής	Αλληλουχία
OPC 2	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC 3	5'-GGGGGTCTTT-3'
OPC 9	5'-CTCACCGTCC-3'
OPC 12	5'-TGTCATCCCC-3'
OPC 15	5'-TGCGTGCTTG-3'
OPC 16	5'-CACACTCCAG-5'

Πίνακας 9. Συνθήκες του προγράμματος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης κατά RAPD

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	6	-
Αποδιάταξη	94	1.00	-
Επανυβριδισμός	38	1.00	35
Επέκταση	72	1.30	-
Τελική Επέκταση	72	7	-

4.5.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και για τους δύο δείκτες για κάθε γενότυπο αναμείχθηκαν με 2μL διαλύματος φόρτωσης και ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα σε πηκτή αγαρόζης (1.5%) στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Η παρουσία του αιθιδίου κατέστησε δυνατή την παρατήρηση, καταγραφή και φωτογράφιση των πολυμορφισμών των δειγμάτων μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε καταγραφή αυτών και κωδικοποίησή τους με χρήση του δυαδικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία ζώνης συμβολίστηκε με 1 και η απουσία με 0. Κατόπιν ακολούθησε ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος NTSYS 2.01. Ο υπολογισμός των δεικτών ομοιότητας έγινε με χρήση των αλγόριθμων Jaccard και

Dice. Με βάση τα αποτελέσματα κατασκευάστηκαν δενδρογράμματα φυλογενετικής ανάλυσης με τις μεθόδους UPGMA και Neighbour Join. Παράλληλα υπολογίστηκαν παράμετροι όπως ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά περιοχή, ο PIC (Polymorphic Information Content), ο DI (Diversity indices) και ο I (Probability of Identity) που αφορούσαν μόνο το δείκτη SSR. Για τον RAPD ενδιαφέρον εμφανίζουν παράμετροι όπως ο αριθμός των αλληλομόρφων, των πολυμορφικών ζωνών καθώς και το ποσοστό πολυμορφισμού.

Οι αλγεβρικές εξισώσεις που προσδιορίζουν τις παραμέτρους PIC, DI και I παρουσιάζονται παρακάτω:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (1)$$

$$DI = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (2)$$

$$I = \sum_{i=1}^n p_i^4 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2 \quad (3)$$

Όπου p_i και p_j οι συχνότητες των i, j αλληλομόρφων στους εξεταζόμενους γενότυπους.

4.6 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μελέτη της βλαστικότητας και της χημικής αντιμετώπισης του ζιζανίου με ζιζανιοκτόνα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση (ANOVA) με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 11.0. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με χρήση του LSD_{0.05}.

Η ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων, όσον αφορά τη βλαστικότητα, εξετάστηκε τόσο στο σύνολο των τιμών όλων των συνθηκών όσο και τμηματικά σε κάθε θερμοκρασία και φωτοπερίοδο. Παράλληλα ANOVA εφαρμόστηκε στους μέσους όρους των τιμών που εξέφραζαν την αποτελεσματικότητα των ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν.

Τέλος στατιστική ανάλυση (MANOVA) πραγματοποιήθηκε και στα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την εφαρμογή των μοριακών δεικτών SSRs και

RAPDs, στο γενετικό υλικό των δειγμάτων του τάτουλα και της αγριομελιτζάνας για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικώς σημαντικών διαφορών τόσο εντός των πληθυσμών όσο και μεταξύ των πληθυσμών των δειγμάτων.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Βιολογία

Το *Datura stramonium* είναι ζιζάνιο ετήσιο που αναπτύσσεται από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο. Η μελέτη της βιολογίας του στη συγκεκριμένη εργασία αφορούσε τις συνθήκες βλάστησης του σπόρου σε ελεγχόμενες συνθήκες και τη μέτρηση του χρόνου εμφάνισης των σημαντικότερων σταδίων ανάπτυξης του φυτού με βάση την κλίμακα B.B.C.H. στον αγρό.

5.1.1. Βλαστικότητα

Η μελέτη της βλαστικότητας του σπόρου 3 βιοτύπων του τάτουλα πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες φωτοπερίοδου (24h σκοτάδι και 16h φως/ 8h σκοτάδι) και θερμοκρασίας (15 και 25°C). Ο σπόρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν του έτους 2003 (Π-B) και 2005 (Π-N, K-N). Εφαρμόστηκαν τέσσερις μεταχειρίσεις (τρίψιμο + GA₃ 1mg/mL, τρίψιμο + GA₃ 0.5mg/mL, H₂SO₄ για 20min + GA₃ 0.5mg/mL και KNO₃ 0,2%) με τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση ενώ η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

Το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης (100%) για τον πράσινο βιότυπο του ζιζανίου με προέλευση τη Νίκαια (Π-N) παρατηρήθηκε στους 25°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι στις μεταχειρίσεις τρίψιμο + GA₃ 1mg/mL και τρίψιμο + GA₃ 0.5mg/mL. Υψηλά επίσης (>80%) ήταν τα ποσοστά βλάστησης και για τις δύο μεταχειρίσεις στην ίδια θερμοκρασία (25°C) και φωτοπερίοδο 8h/ 16h φως/σκοτάδι. Στην ίδια φωτοπερίοδο (8h/ 16h φως/σκοτάδι) εμφανίστηκαν και τα υψηλότερα ποσοστά (92.2% στη μεταχείριση τρίψιμο + GA₃ 1mg/mL και 86.1% στη μεταχείριση τρίψιμο + GA₃ 0.5mg/mL) όσον αφορά τους 15°C ενώ κάτι τέτοιο δε συνέβη στην αυξημένη θερμοκρασία για καμία φωτοπερίοδο (Πίνακας 10).

Το KNO₃ 0,2% έδωσε υψηλά ποσοστά βλάστησης (85-96.6%) στους 25°C και στις δύο φωτοπερίόδους. Αντίθετα το H₂SO₄ για 20min σε συνδυασμό με τη GA₃ 0.5mg/mL παρουσίασε χαμηλά ποσοστά βλάστησης (18.3-35%) σε σύγκριση με τις άλλες επεμβάσεις στο σπάσιμο του λήθαργου των σπόρων.

Πίνακας 10. Βλαστικότητα (%) σπόρου πράσινου βιότυπου (Νίκαια) τάτουλα σε δύο θερμοκρασίες (25°C, 15°C) και δύο φωτοπεριόδους (24h σκοτάδι, 8h/ 16h φως/σκοτάδι).

Επέμβαση	Θερμοκρασία	Φωτοπερίοδος	Βλαστικότητα (%)
Τρίψιμο και GA ₃ 1mg/L	25°C	24h σκοτάδι	100
		16h φως και 8h σκοτάδι	83,3
	15°C	24h σκοτάδι	77,2
		16h φως και 8h σκοτάδι	92,2
Τρίψιμο και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	100
		16h φως και 8h σκοτάδι	85
	15°C	24h σκοτάδι	74,4
		16h φως και 8h σκοτάδι	86,1
H ₂ SO ₄ και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	26,7
		16h φως και 8h σκοτάδι	35
	15°C	24h σκοτάδι	30,5
		16h φως και 8h σκοτάδι	18,3
KNO ₃	25°C	24h σκοτάδι	96,6
		16h φως και 8h σκοτάδι	85
	15°C	24h σκοτάδι	53,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	58,5
C.V. %		24h σκοτάδι	56
		16h φως και 8h σκοτάδι	46
LSD _{0,05}		24h σκοτάδι	7
		16h φως και 8h σκοτάδι	3

Στην περίπτωση του κόκκινου βιότυπου με προέλευση τη Νίκαια (K-N) η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη στατιστικών διαφορών μεταξύ των δύο θερμοκρασιών τονίζοντας την επίδρασή της στη βλάστηση. Όσον αφορά τις μεταχειρίσεις η ανάλυση έδειξε την παρουσία διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων τρίψιμο + GA₃ 1mg/mL και τρίψιμο + GA₃ 0.5mg/mL με την H₂SO₄ (20min) + GA₃ 0.5mg/mL. Η τελευταία μεταχείριση διέφερε από όλες ενώ το KNO₃ με το H₂SO₄. (Πίνακας 11)

Τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης για αυτό το βιότυπο, εντοπίστηκαν σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16h/ 8h φως/σκοτάδι που έφθαναν το 96,6% και αφορούσαν όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση το H₂SO₄. Επίσης υψηλά ήταν τα ποσοστά βλάστησης στην ίδια θερμοκρασία και φωτοπερίοδο (24h σκοτάδι) στις

μεταχειρίσεις με τρίψιμο και GA₃. Στις υπόλοιπες συνθήκες, η βλαστικότητα ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα.

Συμπερασματικά λοιπόν και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της βλαστικότητας τόσο στον βιότυπο Π-N όσο και στον Κ-N (Πίνακες 10 και 11) αξίζει να τονιστούν οι αυξημένες τιμές που παρατηρήθηκαν στους 25°C σε σύγκριση με τους 15°C. Το γεγονός αυτό ήταν ως ένα βαθμό αναμενόμενο αφού ο τάτουλας είναι εαρινό ζιζάνιο.

Πίνακας 11. Βλαστικότητα (%) σπόρου κόκκινου βιότυπου (Νίκαια) τάτουλα σε δύο θερμοκρασίες (25°C, 15°C) και δύο φωτοπεριόδους (24h σκοτάδι, 8h/ 16h φως/σκοτάδι).

Επέμβαση	Θερμοκρασία	Φωτοπερίοδος	Βλαστικότητα (%)
Τρίψιμο και GA ₃ 1mg/L	25°C	24h σκοτάδι	86,6
		16h φως και 8h σκοτάδι	96,6
	15°C	24h σκοτάδι	34,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	29,4
Τρίψιμο και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	93,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	96,6
	15°C	24h σκοτάδι	23,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	23,3
H ₂ SO ₄ και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	26,6
		16h φως και 8h σκοτάδι	30
	15°C	24h σκοτάδι	50
		16h φως και 8h σκοτάδι	11
KNO ₃	25°C	24h σκοτάδι	53,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	96,6
	15°C	24h σκοτάδι	52,2
		16h φως και 8h σκοτάδι	22,2
C.V. %		24h σκοτάδι	92
		16h φως και 8h σκοτάδι	90
LSD _{0,05}		24h σκοτάδι	7
		16h φως και 8h σκοτάδι	2

Ο πράσινος βιότυπος με προέλευση το Βελεστίνο (Π-B) παρουσίασε πολύ χαμηλά ποσοστά βλάστησης (Πίνακας 12), από 0 έως 59%, ανάλογα με τη

μεταχείριση. Γενικά τα αποτελέσματα δεν παρουσίασαν συγκεκριμένη τάση αφού σε άλλες μεταχειρίσεις (KNO₃) το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης παρατηρήθηκε στους 15°C και σε άλλες (τρίψιμο και GA₃) στους 25°C. Παρόμοια ήταν και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων στις δύο φωτοπεριόδους. Είναι ενδεχόμενο τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται στο ότι ο σπόρος είχε βαθύ λήθαργο ή μειωμένη βλαστικότητα δεδομένου ότι ήταν ηλικίας 2 ετών σε αντίθεση με τους Π-N και Κ-N, που ήταν 1 έτους.

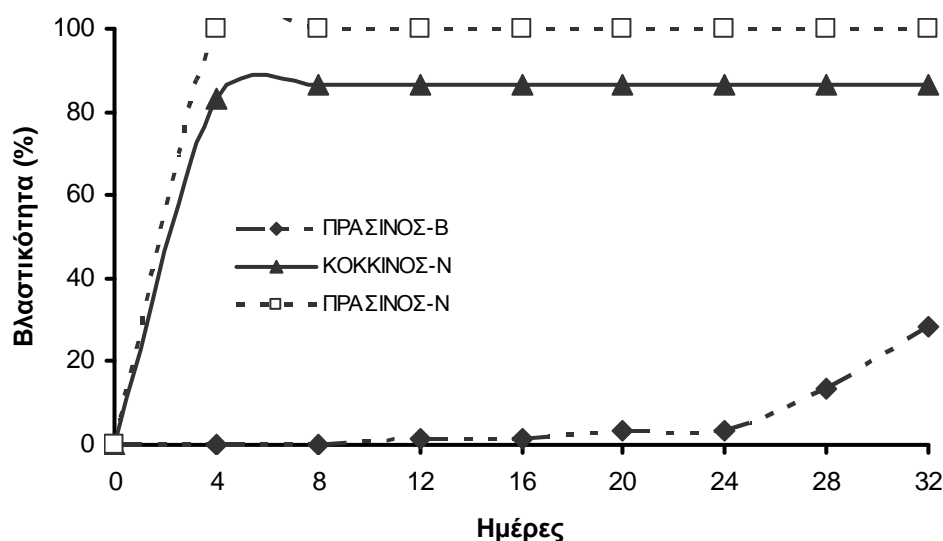
Πίνακας 12. Βλαστικότητα (%) σπόρου πράσινου βιότυπου (Βελεστίνο) τάτουλα σε δύο θερμοκρασίες (25°C, 15°C) και δύο φωτοπεριόδους (24h σκοτάδι, 8h/ 16h φως/σκοτάδι).

Επέμβαση	Θερμοκρασία	Φωτοπερίοδος	Βλαστικότητα (%)
Τρίψιμο και GA ₃ 1mg/L	25°C	24h σκοτάδι	30
		16h φως και 8h σκοτάδι	18,3
	15°C	24h σκοτάδι	3,3
		16h φως και 8h σκοτάδι	1,7
Τρίψιμο και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	15
		16h φως και 8h σκοτάδι	8,3
	15°C	24h σκοτάδι	0
		16h φως και 8h σκοτάδι	1,7
H ₂ SO ₄ και GA ₃ 0.5mg/L	25°C	24h σκοτάδι	0
		16h φως και 8h σκοτάδι	0
	15°C	24h σκοτάδι	59
		16h φως και 8h σκοτάδι	30
KNO ₃	25°C	24h σκοτάδι	0
		16h φως και 8h σκοτάδι	16,7
	15°C	24h σκοτάδι	0
		16h φως και 8h σκοτάδι	0
C.V. %		24h σκοτάδι	175
		16h φως και 8h σκοτάδι	160
LSD _{0,05}		24h σκοτάδι	6
		16h φως και 8h σκοτάδι	25

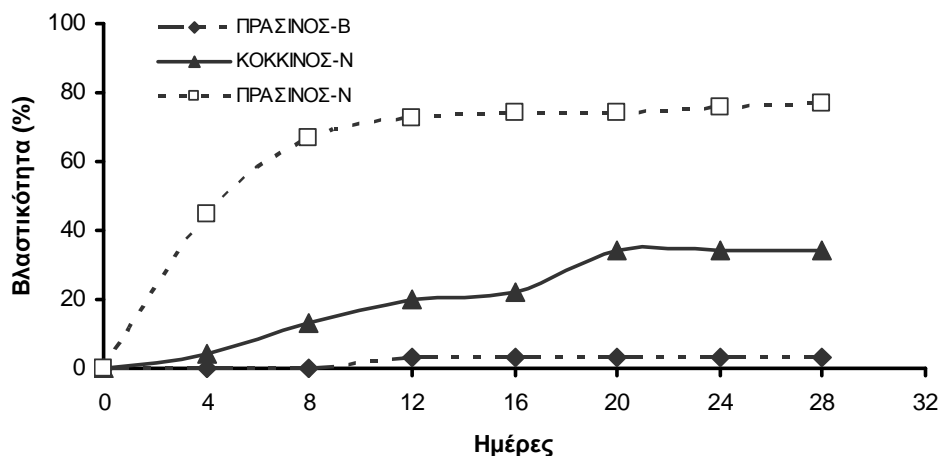
5.1.2. Ρυθμός βλάστησης

Στην προηγούμενη παράγραφο, έγινε μία εκτενής αναφορά στα ποσοστά βλάστησης των τριών βιοτύπων τάτουλα καθώς και στις συνθήκες (θερμοκρασία, φωτοπερίοδο) και μεταχειρίσεις που την επηρεάζουν. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ο ρυθμός βλάστησης των σπόρων, το πόσο γρήγορα δηλαδή επιτυγχάνεται η βλάστηση των σπόρων σε κάθε θερμοκρασία, φωτοπερίοδο και σε συνδυασμό με τις μεταχειρίσεις.

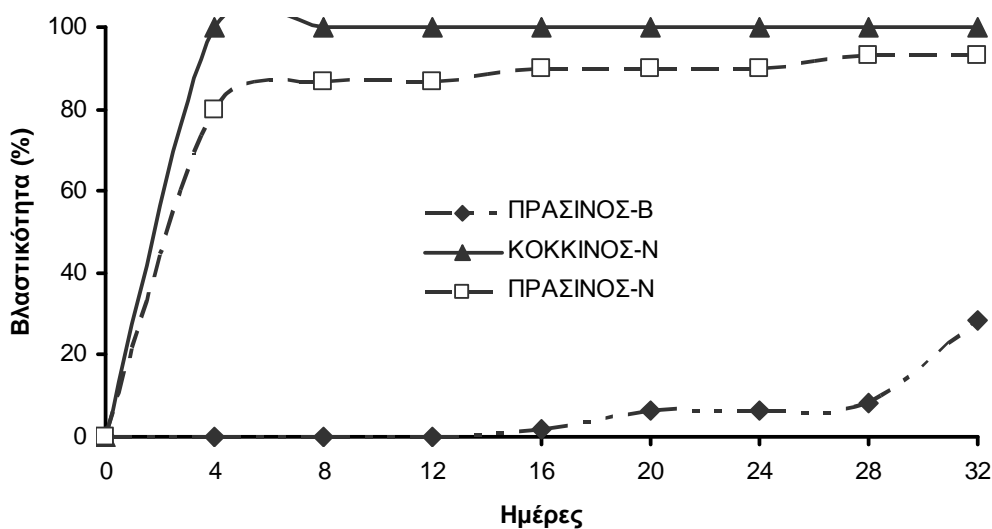
Συγκρίνοντας τις καμπύλες που απεικονίζονται στα σχήματα 2-7 (βλ. και Παράρτημα Σχήμα 5-10) σε μια προσπάθεια διάκρισης των αποτελεσμάτων ανάλογα με την επίδραση της θερμοκρασίας γίνεται αντιληπτή η θετική επίδραση για ακόμη μία φορά της αυξημένης θερμοκρασίας (25°C). Ενδεικτικό είναι το παράδειγμα που έχει εφαρμοστεί στους σπόρους με τρίψιμο σε συνδυασμό με GA₃ 1mg/mL (Σχήμα 2 και 3) όπου στους βιότυπους Π-N και Π-B η βλάστηση του 100 και 80% αντίστοιχα των σπόρων πραγματοποιήθηκε στις 4 πρώτες ημέρες σε φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι και θερμοκρασία 25°C ενώ στους 15°C και την ίδια φωτοπερίοδο μόλις το 65 και 10% των σπόρων αντίστοιχα βλάστησε σε διάστημα 8 ημερών. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στις άλλες μεταχειρίσεις.



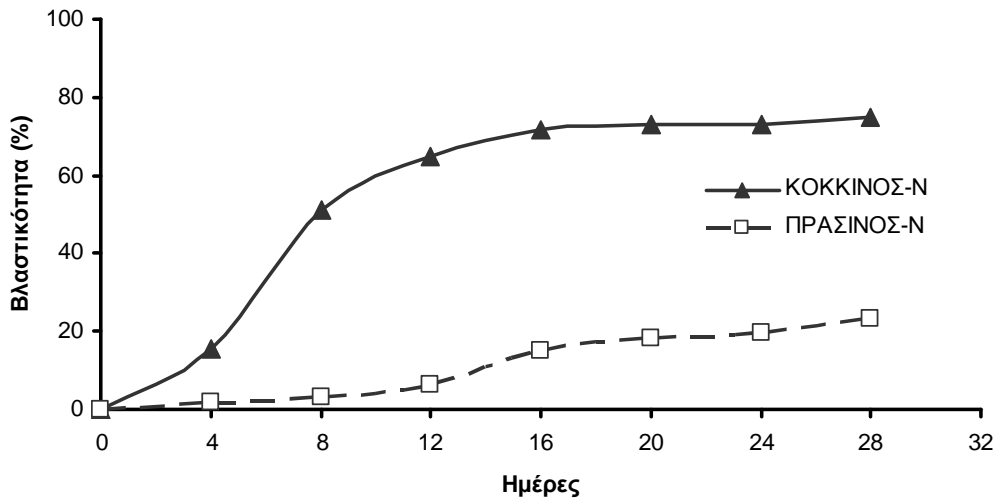
Σχήμα 2. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 1mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



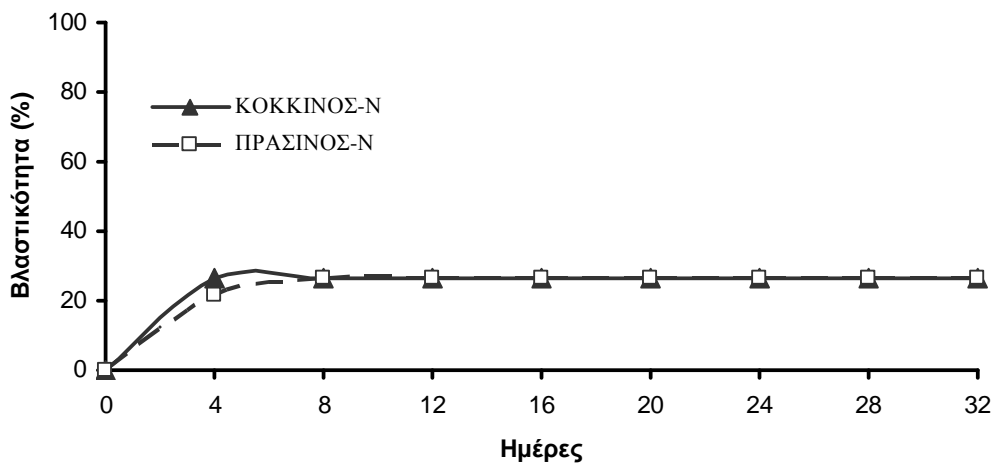
Σχήμα 3. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 1mg/mL σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



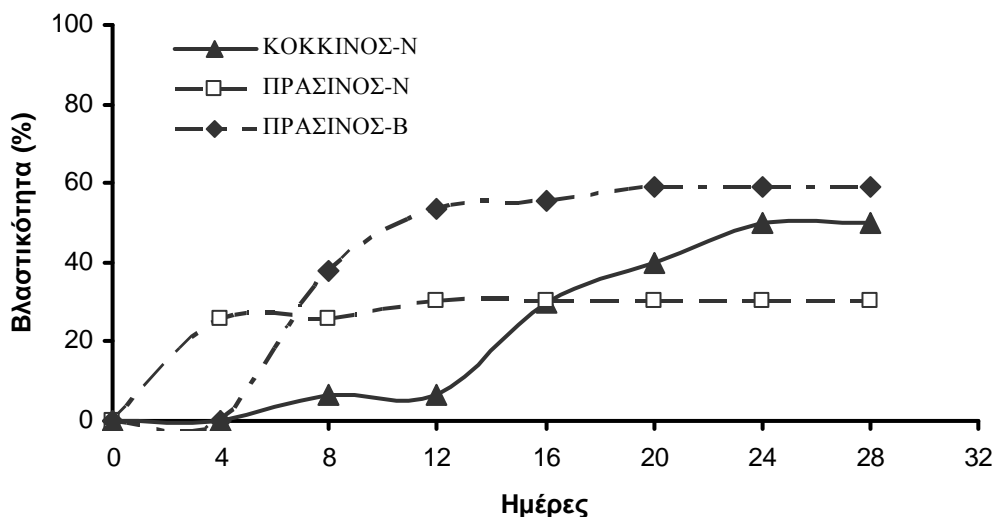
Σχήμα 4. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



Σχήμα 5. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



Σχήμα 6. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από εφαρμογή H₂SO₄ μαζί με GA₃ 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



Σχήμα 7. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσιнос-B, πράσιнос-N, κόκκιнос-B) μετά από εφαρμογή H_2SO_4 μαζί με GA_3 0,5mg/mL σε θερμοκρασία $15^\circ C$ και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.

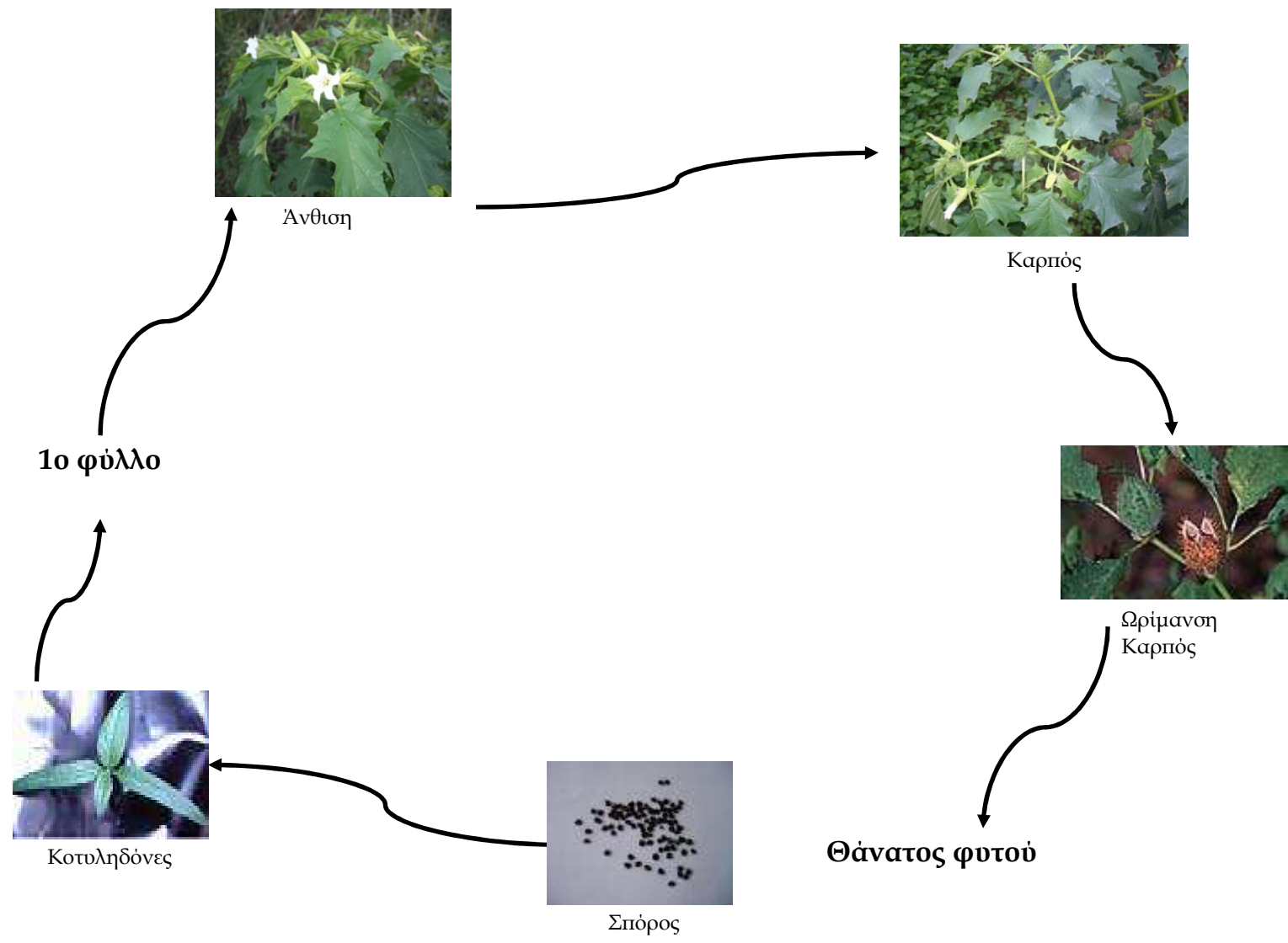
5.1.3. Βιολογικός κύκλος – Στάδια ανάπτυξης

Η μελέτη του βιολογικού κύκλου (Σχήμα 8) του τάτουλα, πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες αγρού. Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία 4-5 μήνες. Σύμφωνα με την κλίμακα B.B.C.H. προσδιορίστηκαν τα σημαντικότερα στάδια ανάπτυξης του φυτού και μετρήθηκαν τα χρονικά διαστήματα εμφάνισής τους από τη σπορά. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παραθέτονται στους Πίνακες 13,14,15.

Όπως φαίνεται στους Πίνακες 13-15, το μεγαλύτερο σε διάρκεια βιολογικό κύκλο, είχε ο πράσιнос βιότυπος με προέλευση το Βελεστίνο (192 ημέρες) ξεπερνώντας τους υπόλοιπους δύο κατά ένα περίπου μήνα (159 ο κόκκιнос-Νίκαια και 133 ο πράσιнос-Νίκαια). Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό, ότι αντίστοιχος ήταν και ο κύκλος που εμφάνισαν αυτοφυή άτομα του ζιζανίου στην περιοχή γεγονός που μας οδηγεί στην υπόνοια για ύπαρξη επίδρασης του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη του φυτού αφού ο συγκεκριμένος βιότυπος συλλέχθηκε στην ίδια περιοχή. Πιο συγκεκριμένα ο χρόνος εμφάνισης ορισμένων από τα άλλα στάδια ήταν η έκπτυξη των κοτυληδόνων στις 14 ημέρες από τη σπορά (ΗΜΣ), η εμφάνιση του 1^{ου} άνθους στις 113 (ΗΜΣ), του καρπού στις 120 (ΗΜΣ) και η ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού στις 192 ημέρες (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Στάδια ανάπτυξης και ημέρες από τη σπορά για τη συμπλήρωση του βιολογικού κύκλου για τον Πράσινο –B βιότυπο τάτουλα.

Κωδικός σταδίου	Περιγραφή	Ημέρες από σπορά
0	Σπορά	0
10	Εμφάνιση κοτυληδόνων	14
11	1ο φύλλο	22
13	3ο φύλλο	34
15	5ο φύλλο	34
31	1ο Μ.Δ.	40
33	3ο Μ.Δ.	47
35	5ο Μ.Δ.	70
51	Εναρξη έκπτυξης άνθους	102
59	Πλήρης έκπτυξη άνθους	113
71	Εμφάνιση καρπών	120
81	Έναρξη ωρίμανσης καρπού	154
89	Πλήρης ωρίμανση καρπού	157
97	Ολοκλήρωση βιολογικού κύκλου	192



Σχήμα 8. Βιολογικός κύκλος *D. stramonium*

Οι πράσινοι και κόκκινοι βιότυποι με προέλευση τη Νίκαια, εμφάνισαν περίπου τον ίδιο βιολογικό κύκλο. Η έκπτυξη των κοτυληδόνων για αυτούς παρατηρήθηκε στις 16 και 13 ημέρες από τη σπορά, αντίστοιχα. Το 1^ο άνθος εμφανίστηκε στις 53 και 51 ημέρες ενώ η εμφάνιση των καρπών στις 59 και 62 ημέρες αντίστοιχα. Τέλος, η ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού παρατηρήθηκε στις 133 και 159 ημέρες για τους δύο βιότυπους, περίπου δηλαδή σε 4.5-5 μήνες από τη σπορά (Πίνακας 14 και 15).

Πίνακας 14. Στάδια ανάπτυξης και ημέρες από τη σπορά για τη συμπλήρωση του βιολογικού κύκλου για τον Πράσινο –N βιότυπο τάτουλα.

Κωδικός σταδίου	Περιγραφή	Ημέρες από σπορά
0	Σπορά	0
10	Εμφάνιση κοτυληδόνων	16
11	1ο φύλλο	25
13	3ο φύλλο	34
15	5ο φύλλο	38
31	1ο Μ.Δ.	38
33	3ο Μ.Δ.	43
35	5ο Μ.Δ.	48
51	Εναρξη έκπτυξης άνθους	45
59	Πλήρης έκπτυξη άνθους	53
71	Εμφάνιση καρπών	59
81	Έναρξη ωρίμανσης καρπού	87
89	Πλήρης ωρίμανση καρπού	90
97	Ολοκλήρωση βιολογικού κύκλου	133

Πίνακας 15. Στάδια ανάπτυξης και ημέρες από τη σπορά για τη συμπλήρωση του βιολογικού κύκλου για τον Κόκκινο-Ν βιότυπο τάτουλα.

Κωδικός σταδίου	Περιγραφή	Ημέρες από σπορά
0	Σπορά	0
10	Εμφάνιση κοτυληδόνων	13
11	1ο φύλλο	23
13	3ο φύλλο	30
15	5ο φύλλο	37
31	1ο Μ.Δ.	37
33	3ο Μ.Δ.	42
35	5ο Μ.Δ.	47
51	Εναρξη έκπτυξης άνθους	41
59	Πλήρης έκπτυξη άνθους	51
71	Εμφάνιση καρπών	62
81	Έναρξη ωρίμανσης καρπού	97
89	Πλήρης ωρίμανση καρπού	101
97	Ολοκλήρωση βιολογικού κύκλου	159

5.2. Μορφολογία

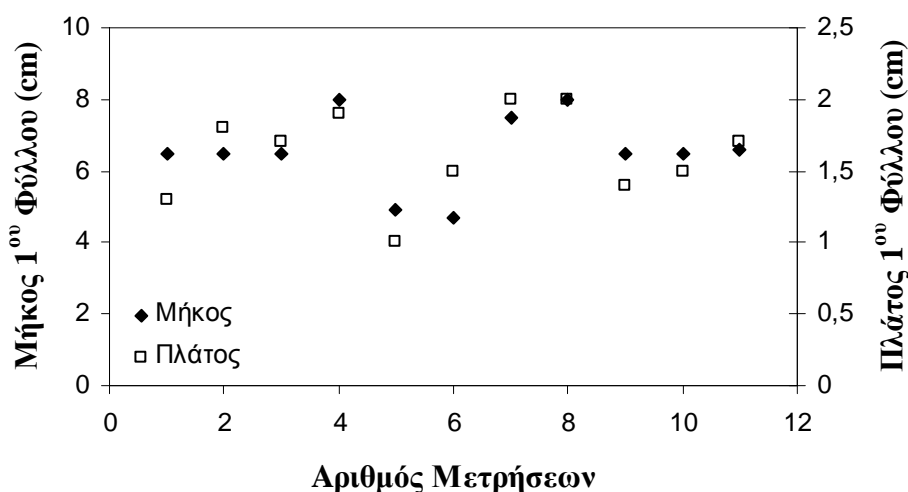
Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του τάτουλα μελετήθηκαν σε συνθήκες αγρού. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε φυτά που σπάρθηκαν σε πειραματικά τεμάχια όσο και σε αυτοφυή. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούσαν τα φύλλα, τα άνθη, το βλαστό, τους καρπούς και τους σπόρους.



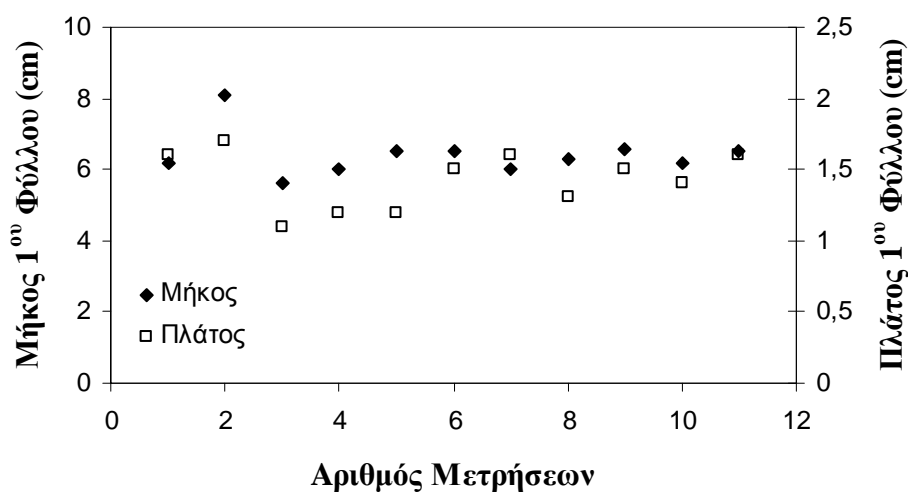
Σχήμα 9. Κοτυληδόνες φυτού τάτουλα.

Οι **κοτυληδόνες** (Σχήμα 9) του ζιζανίου ήταν ιδιαίτερα επιμήκεις με έντονη αυλάκωση στην πάνω επιφάνεια. Τα **φύλλα** του τάτουλα βρίσκονταν σε ελικοειδή διάταξη, σκούρου πράσινου χρώματος, έμμισχα και φέραν έντονες νευρώσεις. Το

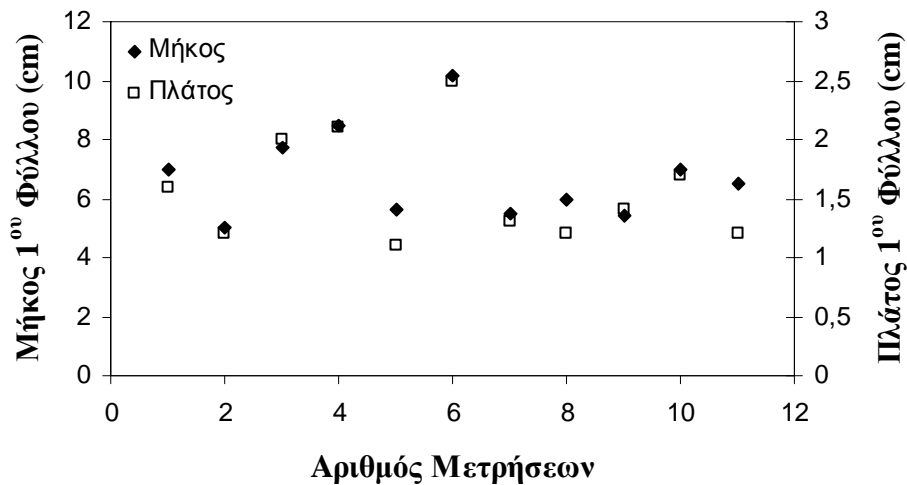
μέγεθός τους ήταν σχετικά μεγάλο και στην περιφέρειά τους σχημάτιζαν εγκοιλώσεις που συνοδεύονταν από οδοντωτό κυματισμό. Στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν οι διαστάσεις του 1^{ου} πραγματικού φύλλου, όπως αυτό ήταν στη φάση εκτίμησης του τελικού ύψους των φυτών. Οι τρεις βιότυποι δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τις διαστάσεις. Κατά μέσο όρο, το μήκος τους ήταν από 6.4-6.7cm και το πλάτος τους 1.4-1.6 cm (Σχήμα 10-12). Το μήκος του μίσχου έφθανε τα 2.3cm. Διαφοροποίηση παρατηρήθηκε για τον κόκκινο σε σύγκριση με τους πράσινους βιότυπους ως προς το χρώμα των νευρώσεων των φύλλων όπου στον κόκκινο ήταν κοκκινωπές και αντίστοιχα στους πράσινους, πρασινωπές.



Σχήμα 10. Μετρήσεις του μήκους και πλάτους του 1^{ου} πραγματικού φύλλου σε φυτά *D. stramonium* του βιότυπου II-N.



Σχήμα 11. Μετρήσεις του μήκους και πλάτους του 1^{ου} πραγματικού φύλλου σε φυτά *D. stramonium* του βιότυπου K-N.



Σχήμα 12. Μετρήσεις του μήκους και πλάτους του 1^{ου} πραγματικού φύλλου σε φυτά *D. stramonium* του βιότυπου Π-Β.

Το άνθος (Σχήμα 13) του τάτουλα αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του φυτού. Έχει σχήμα χωνιού και ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μετρήθηκαν η διάμετρος της στεφάνης που κυμαίνονταν 4.8-5.8cm, το μήκος του μίσχου που ήταν 1.1cm, το μήκος του κάλυκα που ήταν 4.4-5.1cm και το μήκος των πετάλων που ήταν 4.2-5.4cm. Οι μεγαλύτερες τιμές που μετρήθηκαν αφορούσαν τον κόκκινο βιότυπο του ζιζανίου που συνεπάγονται μεγαλύτερο μέγεθος άνθους το οποίο ξεχωρίζει και για το χρώμα του. Σ' αυτό το βιότυπο (κόκκινο) το άνθος φέρει μοβ χρωματισμό στη βάση των πετάλων του ενώ στους πράσινους βιότυπους είναι λευκό.



Σχήμα 13. άνθος του κόκκινου (αριστερά) και πράσινου (δεξιά) βιότυπου τάτουλα.

Ο βλαστός του ζιζανίου είναι όρθιος, μακρύς, κοκκινωπού χρώματος για τον κόκκινο βιότυπο και πράσινου για τους πράσινους βιότυπους. Τα 1^ο, 3^ο και 5^ο μεσογονάτια διαστήματα κυμαίνονταν από 1.56-2.58cm, 1.9-2.58cm και 2.74-4.2cm αντίστοιχα (Πίνακας 16). Το ύψος τους ήταν κατά μέσο όρο για τον πράσινο με προέλευση το Βελεστίνο και τη Νίκαια βιότυπο 102 και 112cm αντίστοιχα ενώ για τον κόκκινο έφθανε τα 131cm (Πίνακας 17).

Πίνακας 16. Μήκος 1^{ου}, 3^{ου} και 5^{ου} μεσογονάτιου διαστήματος φυτών τριών βιοτύπων τάτουλα (Πράσινος-Νίκαια, Πράσινος-Βελεστίνο, Κόκκινος-Νίκαια)

	1ο Μ.Δ. (cm)	3ο Μ.Δ. (cm)	5ο Μ.Δ. (cm)
ΠΡΑΣΙΝΟΣ (N)	1.56	1.9	2.74
ΚΟΚΚΙΝΟΣ (N)	2.58	2.4	4.1
ΠΡΑΣΙΝΟΣ (B)	2.06	2.58	4.2

Πίνακας 17. Τελικό ύψος φυτών βιοτύπων τάτουλα (Πράσινος-Νίκαια, Πράσινος-Βελεστίνο, Κόκκινος-Νίκαια)

ΒΙΟΤΥΠΟΣ	ΠΡΑΣΙΝΟΣ (N)	ΚΟΚΚΙΝΟΣ (N)	ΠΡΑΣΙΝΟΣ (B)
ΥΨΟΣ (cm)	102	131	112

Ο καρπός του φυτού είναι κάψα και φέρει αγκάθια στην επιφάνειά του. Οι κάψες των δύο πράσινων βιοτύπων είχαν περίπου των ίδιο αριθμό σπόρων που κυμαινόταν από 190-390 με το βάρος του κάθε σπόρου να είναι κατά μέσο 0.0008g. Στον κόκκινο βιότυπο μετρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός σπόρων ανά κάψα που έφθανε τους 350-570 με βάρος ανά σπόρο 0.006g. Το σχήμα των σπόρων ήταν και στους τρεις βιότυπους νεφροειδές, σκούρου μοβ χρώματος.

5.3. Χημική αντιμετώπιση

5.3.1. Πείραμα στον αγρό

Σε συνθήκες αγρού αξιολογήθηκαν εννέα ζιζανιοκτόνα (6 προφυτρωτικά, 2 μεταφυτρωτικά και 1 ενσωματούμενο). Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν των πλήρως τυχαιοποιημένων ομάδων (RCB) με τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση.

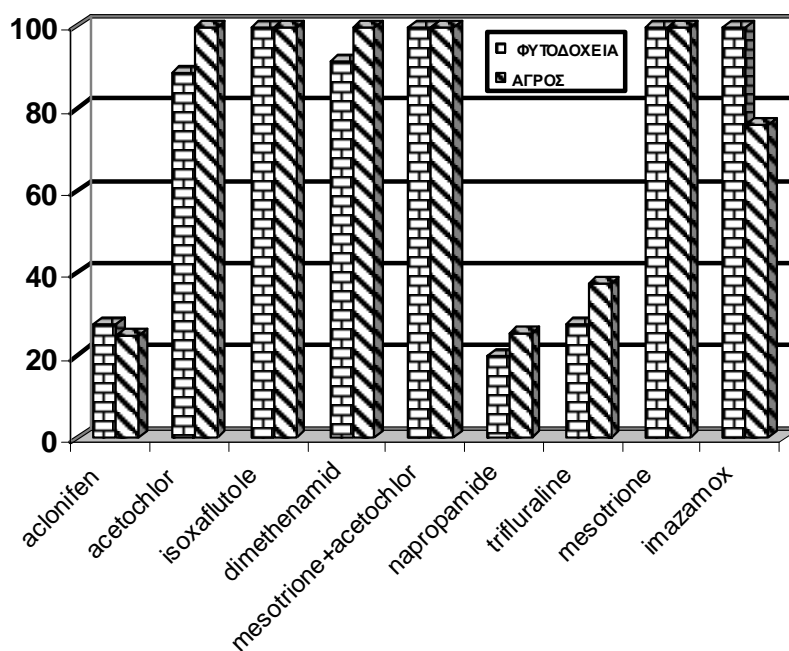
Πλήρη έλεγχο (100%) στον πράσινο με προέλευση τη Νίκαια βιότυπο παρουσίασε η εφαρμογή των προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων acetochlor, isoxaflutole,

dimethenamid, mesotrione+acetochlor και του μεταφουτρωτικού mesotrione (Σχήμα 14). Ικανοποιητικό έλεγχο στον ίδιο βιότυπο παρουσίασε και η χρήση του μεταφουτρωτικού σκευάσματος imazamox (76%). Τα υπόλοιπα ζιζανιοκτόνα εμφάνισαν περιορισμένο έλεγχο που ήταν για κάθε περίπτωση: aclonifen (25%), napropamide (26%) και trifluraline (38%). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τον πράσινο με προέλευση το Βελεστίνο βιότυπο (Σχήμα 16) αλλά και για τον κόκκινο βιότυπο (Σχήμα 15) ως προς το ποια ζιζανιοκτόνα ελέγχουν το ζιζάνιο και ποια όχι με εξαίρεση το imazamox που ανήλθε σε ποσοστό ελέγχου 100% και 81.4% για καθένα από τους δύο. Αναλυτικά τα αποτελέσματα και για τους τρεις βιότυπους φαίνονται στα Σχήματα 14, 15 και 16.

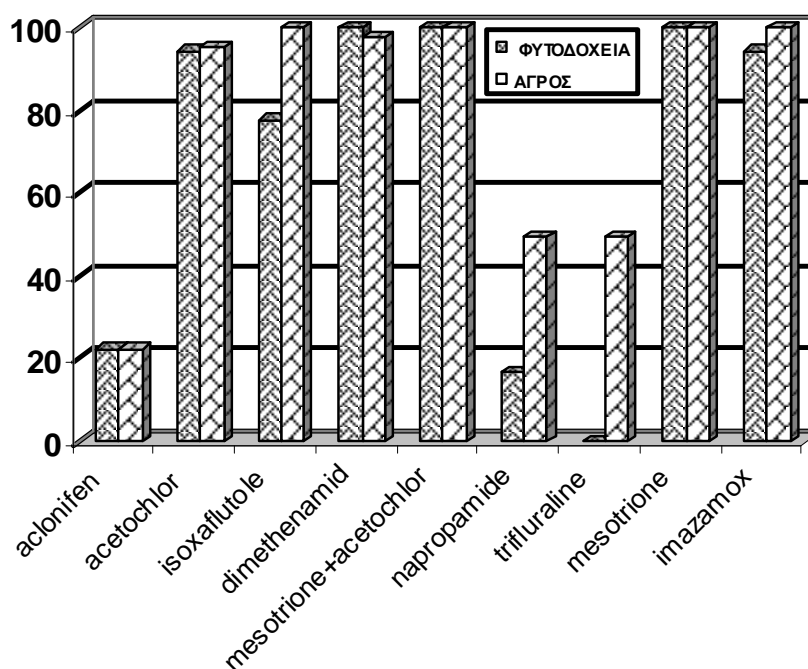
5.3.2. Πείραμα στο εργαστήριο

Η χημική αντιμετώπιση σε συνθήκες εργαστηρίου σε κατάλληλα φυτοδοχεία πραγματοποιήθηκε δύο φορές όπως αναφέρθηκε στα υλικά και μέθοδοι. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στα Σχήματα 14, 15 και 16.

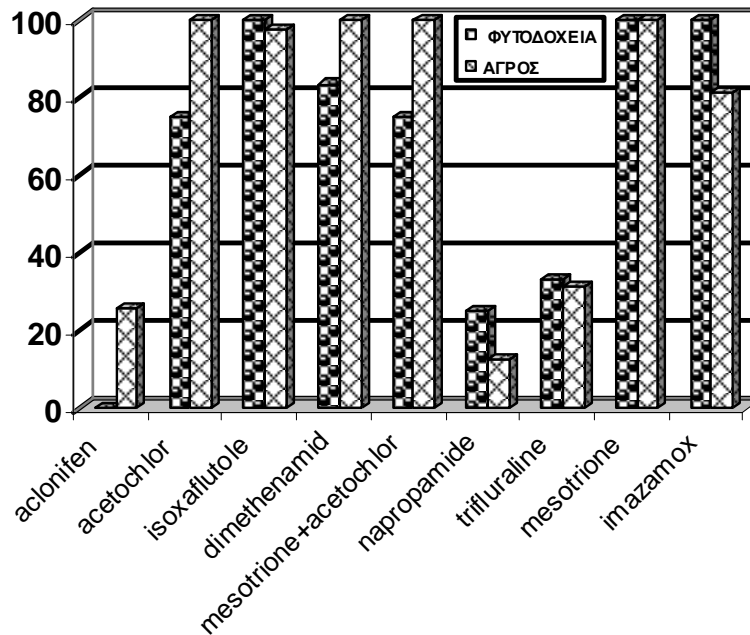
Όσον αφορά τον βιότυπο πράσινο με προέλευση τη Νίκαια, ικανοποιητικό έλεγχο, μεγαλύτερο από 75% έδωσαν τα προφουτρωτικά ζιζανιοκτόνα isoxaflutole (100%), mesotrione+acetochlor (100%), acetochlor (89%), dimethenamid (92%), μόνο του το μεταφουτρωτικό mesotrione (100%) και το imazamox (100%). Τα υπόλοιπα ζιζανιοκτόνα έλεγξαν το βιότυπο με παρόμοιο ποσοστό (28%) το aclonifen και το trifluraline αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των επεμβάσεων για τους υπόλοιπους δύο βιότυπους



Σχήμα 14. Αποτελεσματικότητα ζιζανιοκτόνων στον έλεγχο *D. stramonium* του βιότυπου Π-Ν σε συνθήκες εργαστηρίου και αγρού.



Σχήμα 15. Αποτελεσματικότητα ζιζανιοκτόνων στον έλεγχο *D. stramonium* του βιότυπου Κ-Ν σε συνθήκες εργαστηρίου και αγρού.



Σχήμα 16. Αποτελεσματικότητα ζιζανιοκτόνων στον έλεγχο *D. stramonium* του βιότυπου Π-B σε συνθήκες εργαστηρίου και αγρού.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των σχημάτων των τριών βιοτύπων του τάτουλα με ζιζανιοκτόνα παρατηρείται σύγκλιση αυτών ως προς τους δύο χώρους διεξαγωγής του πειράματος. Ο έλεγχος ήταν ο ίδιος για τα ζιζανιοκτόνα τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και σε ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου.

5.4. Μοριακή ανάλυση

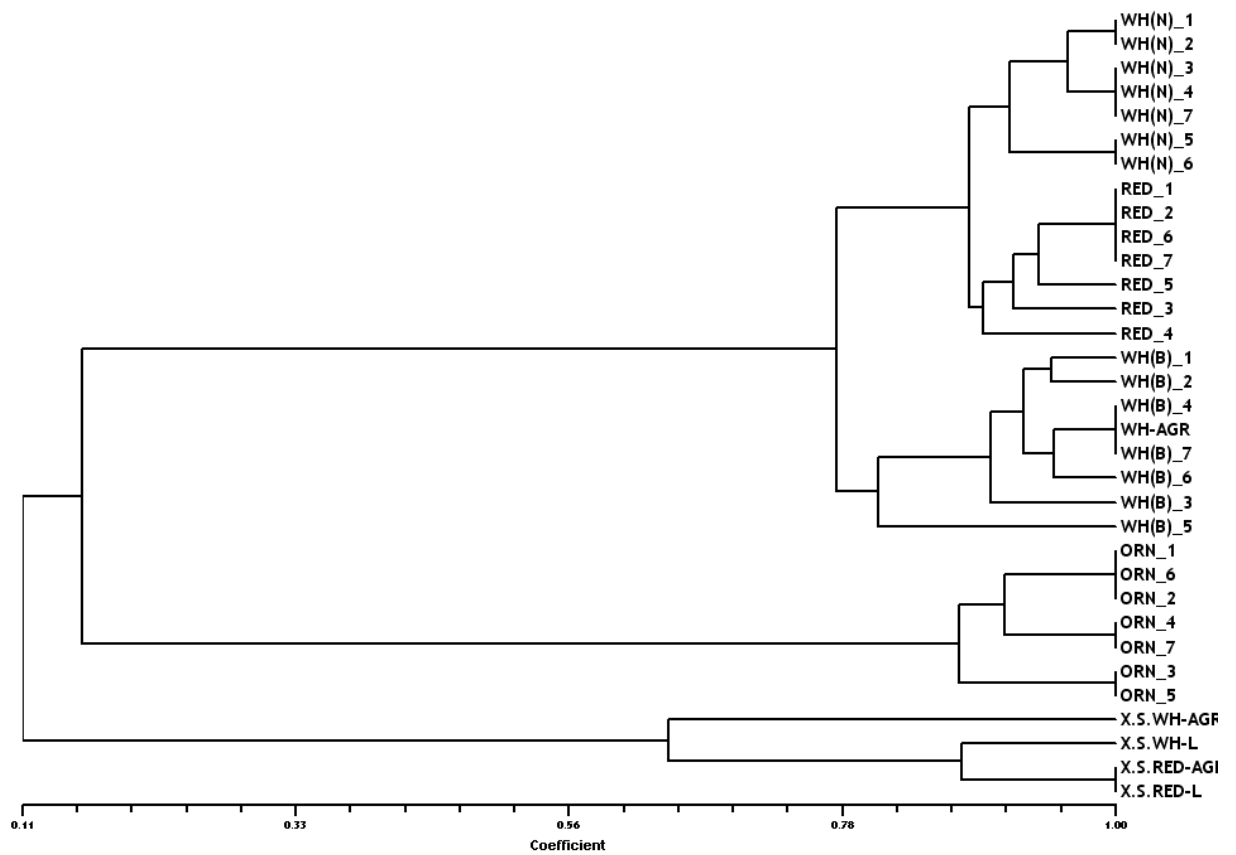
Μοριακή ανάλυση του γενώματος έξι βιοτύπων του είδους *Datura stramonium* (30 δείγματα) και τεσσάρων του *Xanthium strumarium* (4 δείγματα) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών SSR και RAPD.

Στην περίπτωση του δείκτη SSR χρησιμοποιήθηκαν 5 ζεύγη εκκινητών όπου μετά την αντίδραση με το DNA των δειγμάτων τοποθετήθηκε σε πηκτή αгарόζης (1.5%) και με την παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου έγινε φανερή η ύπαρξη πολυμορφισμών μετά από έκθεση σε υπεριώδες φως. Κατά μέσο όρο παρατηρήθηκαν 7.8 αλληλόμορφα ανά εκκινητή (Πίνακας 18) με το μικρότερο αριθμό (5) να εντοπίζεται στον εκκινητή LEct004(TMS29) και το μεγαλύτερο (12) στον LEga004(TMS33). Ο δεύτερος εκκινητής εμφάνισε παράλληλα και το μεγαλύτερο PIC (0.83) και μικρότερο I (0.04) αποτελώντας τον ποιο πληροφοριακό εκκινητή.

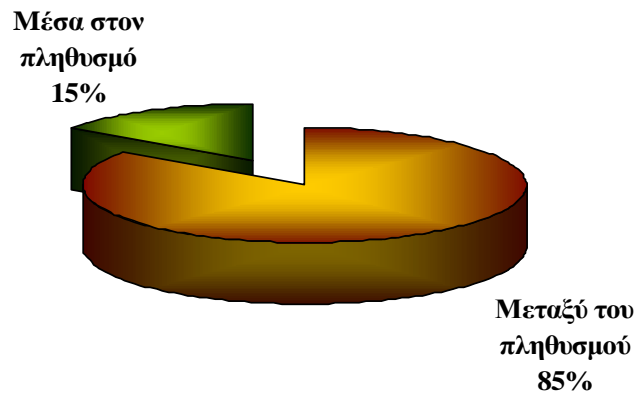
Πίνακας 18. Εκτίμηση αριθμού αλληλομόρφων, PIC, DI και I για το μοριακό δείκτη SSR.

Εκκινητής	Αριθμός Αλληλομόρφων	PIC	DI	I
LEgt001(TMS42)	8	0.7996	0.823	0.05
LEga004(TMS33)	12	0.8346	0.851	0.04
LEta012(AQ368062)	7	0.7904	0.816	0.06
LEat015(TMS23)	7	0.7456	0.781	0.08
LEct004(TMS29)	5	0.6655	0.707	0.13

Το μοριακό πρότυπο κάθε εκκινητή καταγράφηκε και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκε για το σύνολο των γενοτύπων όλων των πληθυσμών. Σε κατάλληλα διαμορφωμένους πίνακες και τη χρήση του δυαδικού συστήματος συμβολίστηκε με 0 η απουσία ζώνης και 1 η παρουσία ζώνης. Τα δεδομένα αφού αναλύθηκαν με βάση το πρόγραμμα NTSYS 2.01 εκτιμήθηκαν οι δείκτες ομοιότητας κατά Jaccard και Dice και πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των ατόμων με τους αλγόριθμους UPGMA και Neighbour Join (Σχήμα 17). Από το δενδρόγραμμα γίνεται φανερή η γενετική απόσταση του καλλωπιστικού τάτουλα από τους πληθυσμούς του ζιζανίου καθώς επίσης και ο διαχωρισμός του κόκκινου από τους πράσινους βιότυπους του ζιζανίου. Κάτι αντίστοιχο συνέβη και για την αγριομελιτζάνα που διαχωρίστηκε και από το γένωμα του τάτουλα κάτι άλλωστε αναμενόμενο. Όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών, 85% μεταξύ των πληθυσμών και μόλις 15% εντός των πληθυσμών (Σχήμα 18).



Σχήμα 17. Γενετικές αποστάσεις κατά Jaccard μεταξύ γενοτύπων του είδους *D. stramonium* και *X. stumarium*, ομαδοποίηση με τη μέθοδο Neighbour Join με βάση τα αποτελέσματα των δεικτών SSRs

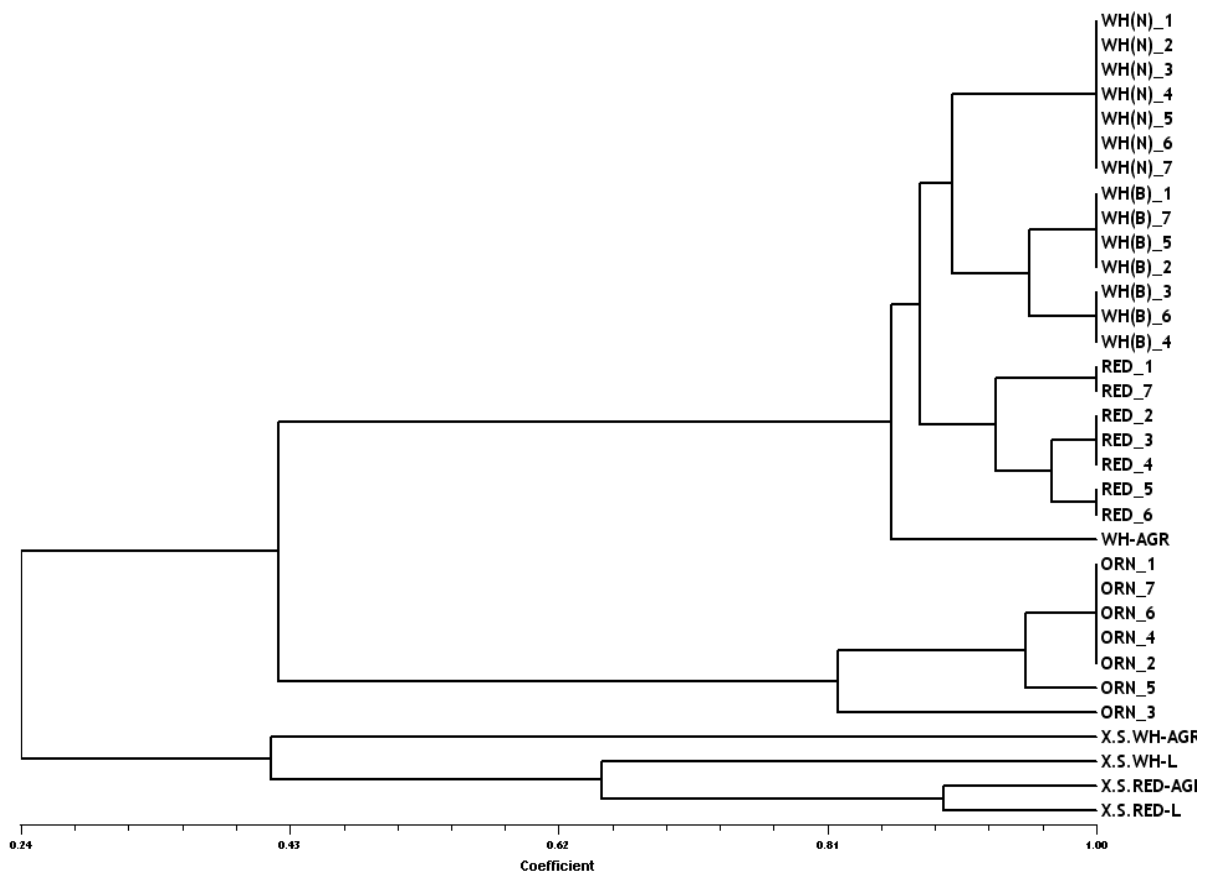


Σχήμα 18. Ανάλυση παραλλακτικότητας των πολυμορφικών ζωνών που ελήφθησαν μετά από εφαρμογή των SSRs μοριακών δεικτών.

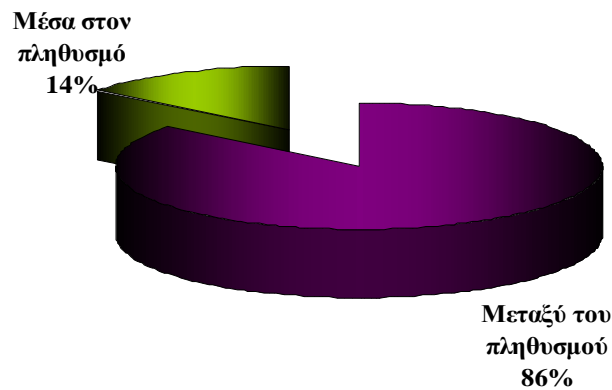
Όσον αφορά το δείκτη RAPD, χρησιμοποιήθηκαν έξι δεκαμερείς, μονόκλωνες αλληλουχίες ως εκκινήτες. Η καταγραφή του μοριακού προτύπου έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και στην περίπτωση του δείκτη SSR όπως άλλωστε αναφέρεται αναλυτικά και στα υλικά και μέθοδοι. Ο συνολικός αριθμός αλληλομόρφων που μετρήθηκαν στο δείκτη RAPD έφθανε τους 50 με τον μεγαλύτερο να εμφανίζει ο OPC 2 (6) και το μικρότερο ο OPC 9 (11). Η συνολική πολυμορφικότητα ανήλθε σε ποσοστό 92% καθώς 46 από τις 50 ζώνες ήταν πολυμορφικές (Πίνακας 19). Και σ' αυτή την περίπτωση αφού αναλύθηκαν τα δεδομένα εκτιμήθηκαν οι δείκτες ομοιότητας και τα άτομα ομαδοποιήθηκαν. Το δενδρόγραμμα (Σχήμα 19) που ακολουθεί περιγράφει με τον καλύτερο τρόπο την ομαδοποίηση των γενοτύπων και των μεταξύ τους αποστάσεων. Ωστόσο, δε θα πρέπει να παραλειφθεί ότι τα αποτελέσματα των δύο δεικτών συγκλίνουν αυξάνοντας την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η στατιστική ανάλυση (MANOVA) των πολυμορφικών ζωνών απέδειξε την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών σε ποσοστό 86% και 14% εντός των πληθυσμών (Σχήμα 20).

Πίνακας 19. Εκτίμηση αριθμού αλληλομόρφων, πολυμορφικών ζωνών και ποσοστό πολυμορφισμού για το μοριακό δείκτη RAPD.

Όνομα εκκινητή	Αριθμός Αλληλομόρφων
OPC 2	6
OPC 3	9
OPC 9	11
OPC 12	8
OPC 15	7
OPC 16	9
Σύνολο	50
Πολυμορφικές Ζώνες	46
Ποσοστό Πολυμορφισμού	92%

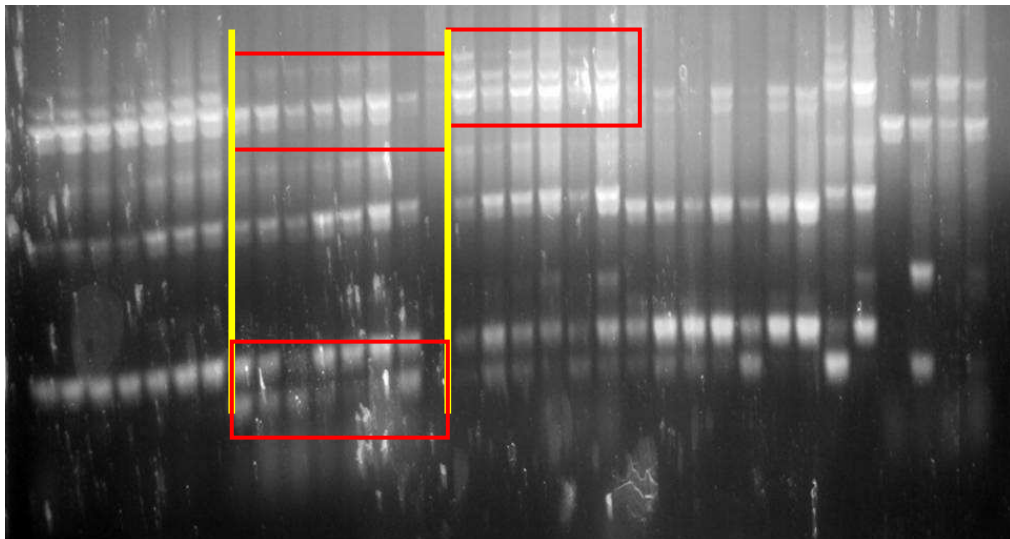


Σχήμα 19. Γενετικές αποστάσεις κατά Jaccard μεταξύ γενοτύπων του είδους *D. stramonium* και *X. stumarium* και ομαδοποίηση με τη μέθοδο Neighbour Join με βάση τα αποτελέσματα του δείκτη RAPD.



Σχήμα 20. Ανάλυση παραλλακτικότητας των πολυμορφικών ζωνών που ελήφθησαν μετά από εφαρμογή των RAPDs μοριακών δεικτών.

Πρότυπο με αυξημένο ενδιαφέρον ήταν αυτό που ελήφθησε από τον RAPD εκκινητή OPC 16 (Σχήμα 21). Παρατηρώντας με προσοχή τις ζώνες των αλληλομόρφων που καταγράφονται στην πηκτή, θα μπορούσαμε ίσως να αναφέρουμε κάποιο διαχωρισμό μεταξύ των πράσινων και κόκκινων βιότυπων. Τόσο στην Ελληνική όσο και στη διεθνή βιβλιογραφία δεν παρουσιάζονται εκτενώς στοιχεία που να αφορούν το ζιζάνιο *D. stramonium* και τη μοριακή του ανάλυση. Το εύρημα που λίγο πριν αναφέρθηκε ίσως θα μπορούσε αποτελέσει αρωγό για περαιτέρω έρευνα.



Σχήμα 21. Απεικόνιση πολυμορφισμών τύπου RAPDs με τη χρήση του εκκινητή OPC16.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο τάτουλας λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας του με τις επιμήκεις κοτυληδόνες και την έντονη αύλακα, τα μεγάλα λευκά ή μοβ άνθη του αλλά και την οσμή που εκπέμπει δύσκολα συγχέεται με κάποιο άλλο ζιζάνιο.

Από τη μελέτη της βιολογίας του βρέθηκε ότι το φυτό ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο σε διάστημα 133 – 192 ημερών από τη σπορά ανάλογα με το βιότυπο. Το διάστημα αυτό παρουσιάζει μεγάλο εύρος, αφού επηρεάζεται η ανάπτυξή του από την προσαρμογή του μητρικού φυτού στις κλιματολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής του. Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του πράσινου – Βελεστίνου βιότυπου ο οποίος είχε διαφορετική γεωγραφική προέλευση από τους υπόλοιπους δύο. Η διαφοροποίηση στο βιολογικό κύκλο εντοπίστηκε από το στάδιο της εμφάνισης του άνθους.

Οι σπόροι χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο του λήθαργου. Τη μεγαλύτερη βλαστικότητα εμφανίστηκε να παρουσιάζει η μεταχείριση με την εφαρμογή του γιββεριλλικού οξέος μετά από τρίψιμο του περιβλήματος με γυαλόχαρτο. Σημαντική θεωρείται και η επίδραση της θερμοκρασίας στη βλαστικότητα των σπόρων όπου η αυξημένη τιμή της (25°C) δίνει εμφανώς καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χαμηλή (15°C).

Όσον αφορά τα μορφολογικά γνωρίσματα των βιοτύπων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με εξαίρεση το χρώμα των ανθέων και βλαστών. Το ανάστημα του κόκκινου – Νίκαιας βιότυπου εμφανίζεται μεγαλύτερο, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε εδαφικούς παράγοντες αλλά και σφάλματα κατά την άρδευση.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, προκειμένου να προσδιοριστούν κάποιες δραστικές ουσίες που ελέγχουν σε ικανοποιητικό βαθμό το ζιζάνιο, δοκιμάστηκαν 9 ζιζανιοκτόνα (6 προφυτρωτικά, 2 μεταφυτρωτικά και 1 προσπαρτικό ενσωματούμενο), τόσο στον αγρό όσο και στο εργαστήριο. Τα περισσότερα από τα προφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα τόσο στον αγρό όσο και στα φυτοδοχεία, έδωσαν έλεγχο >75% και αυτά ήταν τα : acetochlor, isoxaflutole, dimethenamid, mesotrione + acetochlor. Μεταξύ των μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων, βρέθηκε να ελέγχουν το ζιζάνιο το mesotrione όπως και το ζιζανιοκτόνο imazamox.

Η χρήση των μοριακών δεικτών SSR και RAPD σε γενετικό υλικό βιοτύπων τάτουλα και αγριομελιτζάνας, οδήγησαν σε ενδείξεις διαχωρισμού των κόκκινων από τους πράσινους βιότυπους και στα δύο είδη. Παρόλα αυτά η ομαδοποίηση των

ατόμων του ίδιου γενώματος ήταν εμφανής. Αξιόλογη κρίθηκε επίσης η γενετική απόσταση μεταξύ του καλλωπιστικού τάτουλα από τους βιότυπου του ζιζανίου του ίδιου φυτού όπως και της αγριομελιτζάνας από το ζιζάνιο τάτουλα. Τα συμπεράσματα αυτά θεωρούνται ιδιαίτερα αξιόπιστα μετά την εφαρμογή δύο μοριακών δεικτών (SSR και RAPD) τα αποτελέσματα των οποίων συγκλίνουν.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alarcon S. and A. Pinedo, 2000.** *Datura stramonium*. Medical Plants of the Southwest.
- Andersen, R., 1968.** Germination and Establishment of Weeds for Experimental purposes. A Weed Science society of America Handbook, 59-60
- Anderson, W.P., 1996.** Weed Science: Principles and Applications. West Publishing Co. pp. 388.
- Berkov, S., R. Zayed and T. Doncheva, 2006.** Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 77:179-182.
- Binev R., I. Valchev and J. Nicolov, 2006.** Haematological studies on Jimson Weed (*Datura stramonium*) intoxication in horses. *Trakia Journal of Sciences*, 4: 43-48.
- Blakeslee, A.F., 1931.** "Extra Chromosomes, A Source of Variations in the Jimson Weed." Annual Report of the Board of Regents o the Smithsonian institution 1930. Washington: US Government Printing Office.
- Clark, J.D., 2005.** The History, Complications, and Treatments of Jimson Weed Toxicity. *Top. Emerg. Med.*, 27: 295-301.
- Deng F., 2005.** Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 82: 16-26.
- Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2002.** Ζιζανιολογία – Ζιζάνια – Ζιζανιοκτόνα – Περιβάλλον Αρχές και Μέθοδοι διαχείρισης. Εκδόσεις Αγρότυπος.
- Edwards, D., 2005.** Reregistration Eligibility Decision for Napropamide. Prevention, Pesticides and Toxic substances, Case No. 2450.
- Esau, R., 2000.** Weed management in Tree Nurseries. Alberta Agriculture. Food and Rural Development.
- Φασούλας, Α., 1992.** Στοιχεία Πειραματικής Στατιστικής. Θεσσαλονίκη.
- Forrester, M.B., 2006.** Jimsonweed (*Datura stramonium*) exposures in Texas, 1998-2004. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69: 1757-1762.
- Hall, D.W., V.V. Vandiver and J.A. Ferrell.** Jimson Weed, *Datura stramonium* L. University of Florida.
- Hatzios, K.K., 1998.** Herbicide Handbook Supplement to Seven Edition – 1998. Weed Science Society of America, pp. 104.
- Heiser, C.B., Jr. Nightshades, 1969.** The Paradoxical Plants. San Francisco: WH Freeman and Co.

Herbicide Handbook Committee, 2003. Herbicide handbook of the weed science society of America, 5th ed. Weed Science Society of America, Champaign, IL. pp. 515.

Hess, M., G. Barralis, H. Bleiholder, L. Buhr, T. Eggers, H. Hack and R. Stauss, 1997. Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research*, 37: 433-441.

Janson, O., 1974. Interaction between 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Vitamin K in *Datura stramonium*. *Physiologia plantarum*, 30: 153-157.

JianHua, Z.M., L. Salas, N.R. Jordan., and S.C. Weller, 1999. Biorational approaches to managing *Datura stramonium*. *Weed Science*, 47: 750-756.

Lehoczky, E., T. Nemeth, P. Reisinger, L. Radimszky, T. Komives, 2006. Effect of Weediness on the Water content of the soil: A Field Study. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37: 2673-2678.

Levitt, J. and J.V. Lovett, 1984. Activity of allelochemicals of *Datura stramonium* L. (Thorn-apple) in contrasting soil types. *Plant and soil*, 79: 181-189.

Litt, M., J.A. Luty, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet*, 44: 397-401.

Llamas, M.E., Z.E. Mejia, V.A.G. Hernandez, C.L. Diaz, S.J.A. Rincon and O.D.L. Martinez, 1998. Effect of temperature on symptom expression and accumulation of tomato spotted wilt virus in different host species. *Plant pathology*, 47: 341-347.

Λόλας, Π.Χ., 2007. Ζιζάνια-Ζιζανιοκτόνα. Τύχη και συμπεριφορά στο Περιβάλλον. Θεσσαλονίκη. 2^η Έκδοση.

McKenna, T., 1989. "Plan, Plant, Planet." *Whole Earth Review* (64).

Montanya, S.I. and R.G. Ponce, 2006. Competition for nitrogen between Thorn Apple and Tomato and Pepper. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 565-574.

Motten, A.F. and J. Antonovics, 1992. Determinants of outcrossing rate in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 79: 419-427.

Mountain, W.L., 1987. Jimsonweed, *Datura stramonium* L. Pennsylvania Department of Agriculture Bureau of Plant Industry. *Regulatory Horticulture*, 13.

Narwal, S.S., 1994. Allelopathy in crop production. *Scientific Publ.*, Jodhpur, India, 135-136.

Ormeno, J., P. Sepulveda, R. Rojas and J.E. Araya, 2006. *Datura* Genus Weeds as an Epidemiological Factor of *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), and *Potato virus Y* (PVY) on Solanaceous crops. *Agricultura tecnica*, 66: 333-341.

Oudhia, P., 2000. Allelopathic research on rice seeds in Chhattisgarh (India) region : An Overview. *Advances in Agricultural Research in India*. 15: 69-80.

Sanseovic T. Weed and weeds management in tomato. Details from single countries.

Sanchez, R.A., L. Sunell, J.M. Labavitch and B.A. Bonner, 1990. Changes in the endosperm Cell Walls of two *Datura* Species before Radicle Protrusion. *Plant Physiology*, 93: 89-97.

Scott, G.H., S.D. Askew, J.W. Wilcut and C. Brownie, 2000. *Datura stramonium* interference and seed rain in *Gossypium hirsutum*. *Weed Science*, 48: 613-617.

Talaty, N., Z. Takats, and R.G. Cooks, 2005. Rapid *in situ* detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst*, 130: 1624-1633.

Vasilakoglou, I.B., and Eleftherohorinos I.G., 1997. Activity, adsorption, mobility, efficacy and field persistence of alachlor as affected by formulation. *Weed Science*, 45: 560-565.

Valverde, P.L., J. Fornoni and J. Nunez-Farfan, 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. *J. Evol. Biol.*, 16: 127-137.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

www.henriettesherbal.com/eclectic/usdisp/datura_stra.html

http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-04212002-105357/unrestricted/greg_04_chapter_2.pdf

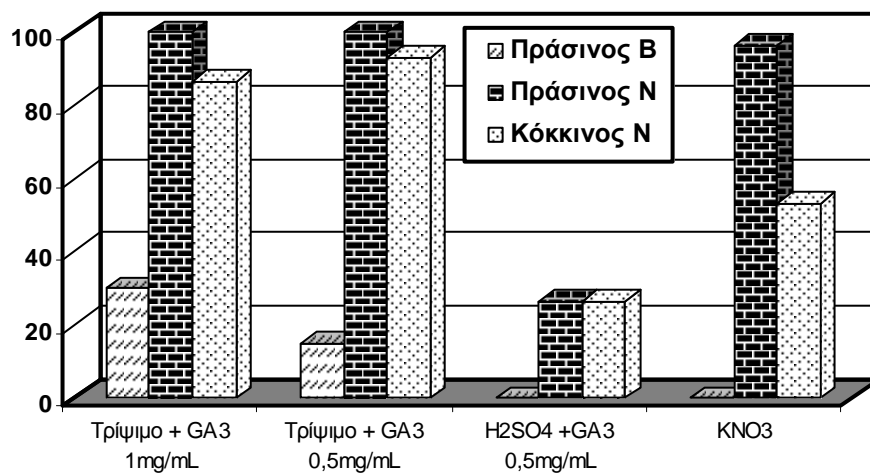
www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thorna12.html

<http://image.fs.uidaho.edu/vide/family124.htm#Datura%20stramonium>

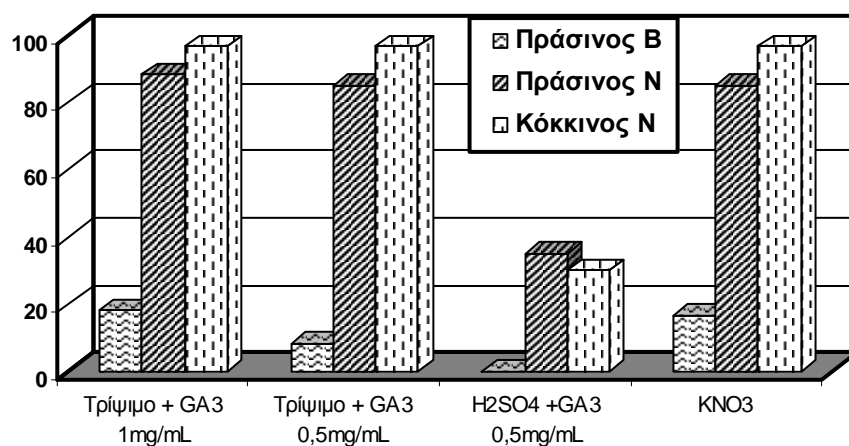
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA (CTAB method)

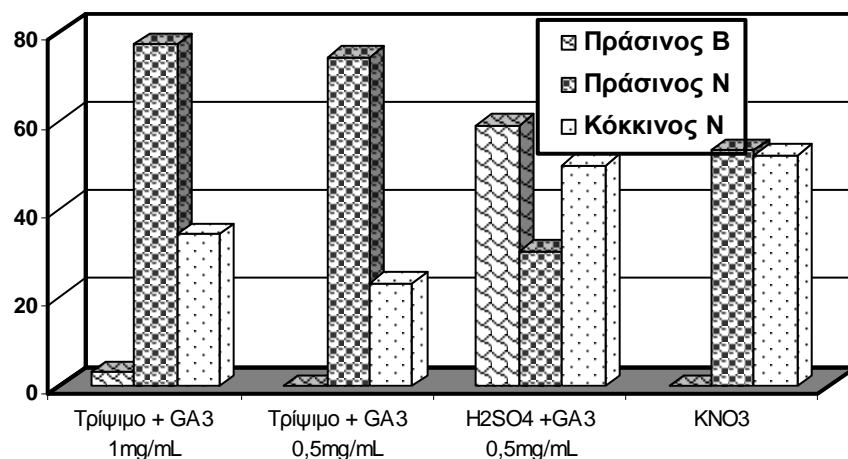
- ④ Put a suitable amount of CTAB buffer in the water bath at 60-65°C in the fume hood (10mL/sample are needed). Put the 50-mL centrifuge tubes on ice.
- ④ Grind 1g of young leaf tissue in liquid nitrogen.
- ④ Quickly transfer with a spatula the leaf powder to a 50-mL centrifuge tube add 10mL CTAB buffer and 100μL of β-mercaptoethanol (1% v/v). Swirl gently with the spatula and leave in the water bath for 10-15min.
- ④ Add 10mL chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v) made fresh. Invert gently 100 times the tube (open the cap at intervals to allow gas leaking). Keep at room temperature until all samples are processed.
- ④ Centrifuge at 6000 rpm for 25-30min at 15-20°C.
- ④ Under the fume hood, collect the aqueous phase (top phase) into another centrifuge tube, using 1mL cut tip.
- ④ Add at least 2/3 of the volume of isopropanol and NH₄-acetate to bring solution to 0.1M. Swirl gently and put in the freezer -20 °C for at least 30min.
- ④ Wash twice with 70% EtOH (900 μL) and 0.1M acetate/acetic acid buffer pH 6.0.
- ④ Rinse with absolute EtOH and dry in the oven at 37 °C for 5-10min.
- ④ Resuspend in 1mL TE or move to the following step, if required.



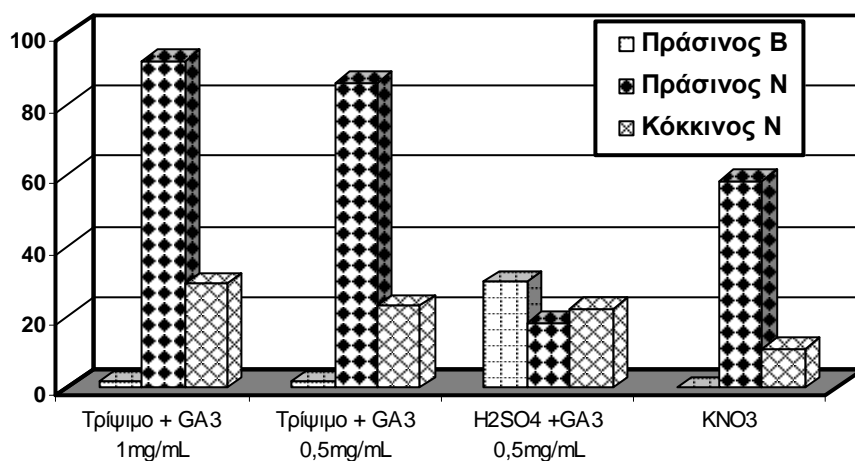
Σχήμα 1. Βλαστικότητα (%) σπόρων τάπουλα τριών βιοτύπων (πράσινος-Β, πράσινος-Ν, κόκκινος-Β) σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



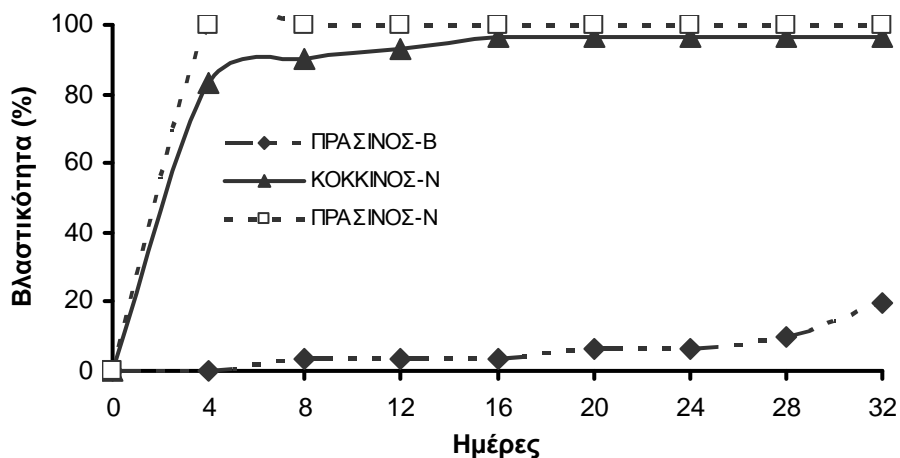
Σχήμα 2. Βλαστικότητα (%) σπόρων τάπουλα τριών βιοτύπων (πράσινος-Β, πράσινος-Ν, κόκκινος-Β) σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



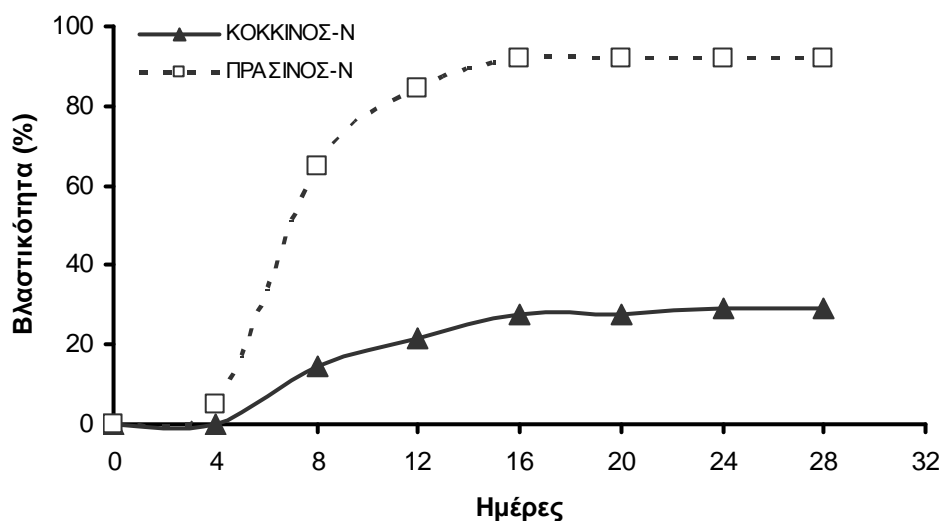
Σχήμα 3. Βλαστικότητα (%) σπόρων τάτουλα τριών βιοτύπων (πράσινος-Β, πράσινος-Ν, κόκκινος-Β) σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 24h σκοτάδι.



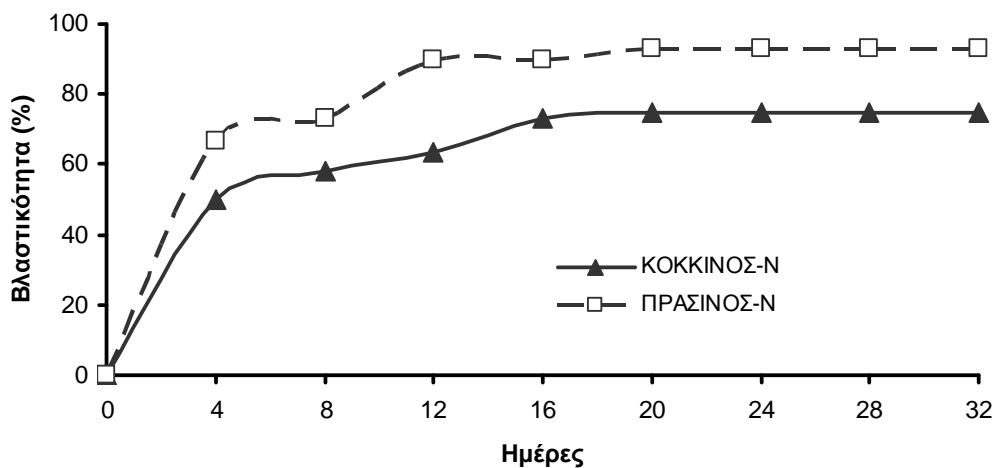
Σχήμα 4. Βλαστικότητα (%) σπόρων τάτουλα τριών βιοτύπων (πράσινος-Β, πράσινος-Ν, κόκκινος-Β) σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



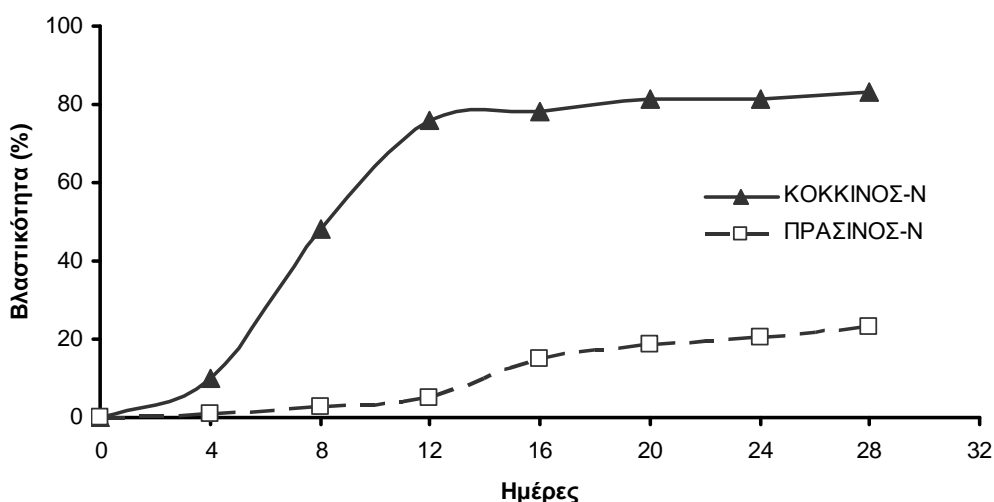
Σχήμα 5. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-B, πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 1mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



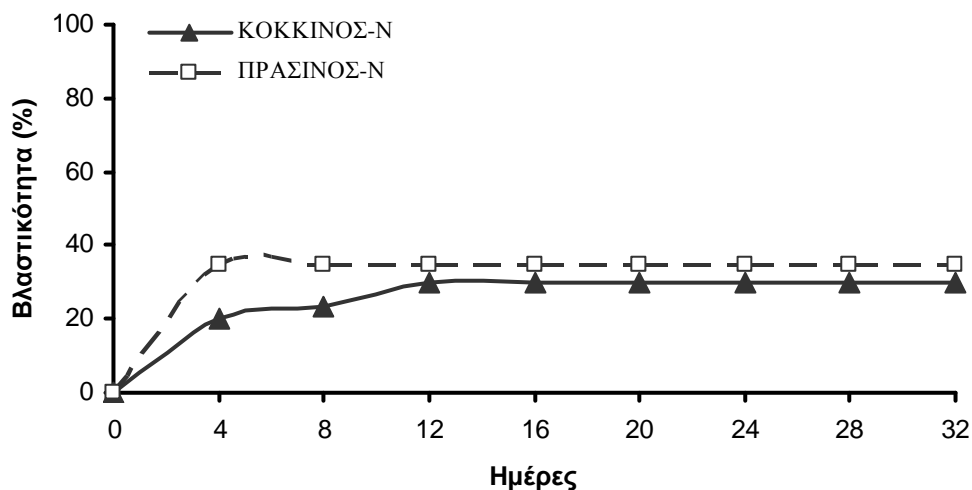
Σχήμα 6. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 1mg/mL σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



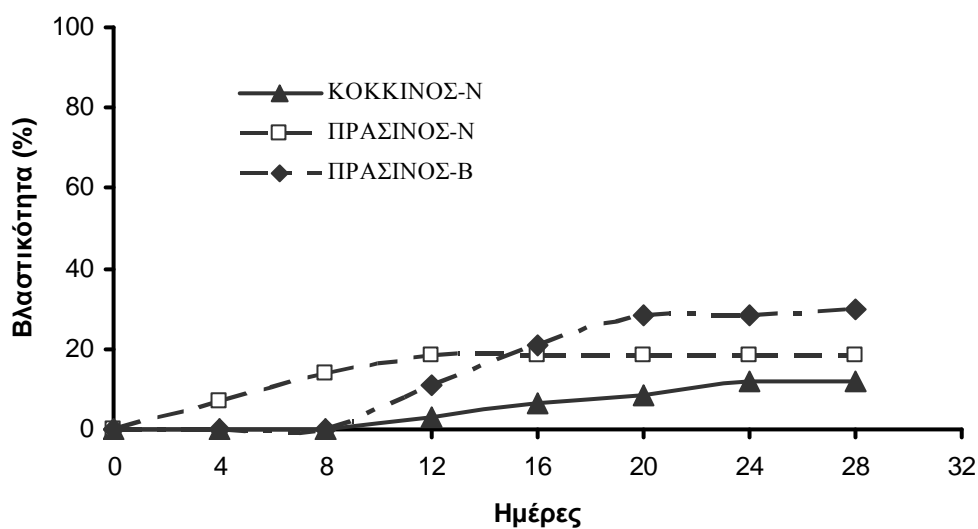
Σχήμα 7. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων λάτουλα (πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



Σχήμα 8. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων λάτουλα (πράσινος-N, κόκκινος-B) μετά από τρίψιμο και εφαρμογή GA₃ 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



Σχήμα 9. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσιнос-N, κόκκινος-B) μετά από εφαρμογή H_2SO_4 μαζί με GA_3 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



Σχήμα 10. Ρυθμός βλάστησης τριών βιοτύπων τάτουλα (πράσιнос-B, πράσιнос-N, κόκκινος-B) μετά από εφαρμογή H_2SO_4 μαζί με GA_3 0,5mg/mL σε θερμοκρασία 15°C και φωτοπερίοδο 16/8h φως/σκοτάδι.



Σχήμα 11. Σπόροι *D. stramonium*.



Σχήμα 12. Αποτελεσματικότητα προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων σε φυτοδοχεία σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Σχήμα 13. Καρπός *D. stramonium* κόκκινου βιότυπου.



Σχήμα 13. Καρπός *D. stramonium* πράσινου βιότυπου.